Aus der Abteilung für Gastroenterologie des
Zentrums für Innere Medizin der Universität
Düsseldorf
(Direktor: Professor Dr. G. Strohmeyer)

Rezeptorvermittelte Transportprozesse - Untersuchungen zum hepatozellulären Transport von Bilirubin und Fettsäuren sowie zur intestinalen Fettsäureresorption

Der Medizinischen Fakultät der Universität
Düsseldorf als Habilitationsschrift vorgelegt

von

WOLFGANG STREMMEL

1985

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Professor Dr. G. Strohmeyer,
meinem langjährigen wissenschaftlichen und klinischen Lehrer,
für die Überlassung des Themas und die stetige Beratung und
Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit,

Herrn Professor Dr. P.D. Berk
für das ständige Interesse und die wertvolle Hilfe bei der
Planung und Durchführung der Studien,

Frau Professor Dr. Hildegard Debuch,
die mich in die biochemischen Arbeitsmethoden einführte und
in deren Labor ich meine ersten wissenschaftlichen Arbeiten
durchführte,

Herrn Professor Dr. F. Borchard (Pathologisches Institut der
Universität Düsseldorf) und Herrn Professor Dr. M. Gerber
(Mount Sinai School of Medicine, New York)
für die elektronenmikroskopischen und immunfluoreszenzmikros-
kopischen Aufnahmen,

Frau Reinhild Hödtke
für ihre ausgezeichnete technische Assistenz.

Die Arbeit wurde durch die Förderung der "Deutschen Forschungs-
gemeinschaft" mit einem Forschungsstipendium (STR 216/1) und
zwei Sachbeihilfen (STR 216/2-1 und STR 216/2-2) ermöglicht.

Abkürzungen

BSA = Rinderserumalbumin

BSP = Bromsulphthalein

ICG = Indozyanin - Grün

LDL = Low Density Lipoprotein

LPM = Leberplasmamembranen

MVM = Microvillöse Membranen des Rattenjejunums

PBS = 0,15 M NaCl / 0,02 M-Phosphatpuffer

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
1.1.	Stand der Forschung	1
1.1.1.	Hepatozelluläre Aufnahme von Bilirubin und verwandten cholephilen Substanzen	2
1.1.2.	Hepatozelluläre Aufnahme von Gallensäuren	4
1.1.3.	Hepatozelluläre Aufnahme von Fettsäuren	5
1.1.4.	Die Albuminrezeptor-Hypothese	6
1.1.5.	Offene Fragen zur zellulären Aufnahme organischer Anionen	7
1.2.	Zielsetzung der Arbeit	9
2.	Materialien und Methoden	10
2.1.	Materialien	10
2.2.	Methoden	11
2.2.1.	Präparation und Analyse von Rattenleberplasmamembranen	11
2.2.2.	Inkubationsexperimente mit Rattenleberplasmamembranen	12
2.2.2.1.	Inkubation von ^{125}J-Rattenalbumin	12
2.2.2.2.	Inkubation von ^{125}J-Insulin und ^{125}J-LDL	14
2.2.2.3.	Inkubation von ^{14}C-Ölsäure	15
2.2.2.4.	Inkubation von ^{35}S-BSP, ^{14}C-Bilirubin und ^{14}C-Taurocholsäure	16
2.2.2.5.	Untersuchungen zur Wirkung der Antikörper gegen das BSP / Bilirubin- und Fettsäure bindende Membranprotein auf die Bindung organischer Anionen an Rattenleberplasmamembranen	16

2.2.3.	Präparation und Analyse von Plasmamembranen der menschlichen Plazenta	17
2.2.4.	Präparation und Analyse von microvillösen Membranen des Rattenjejunums	18
2.2.5.	Inkubation von ^{14}C-Ölsäure mit microvillösen Membranen des Rattenjejunums	19
2.2.6.	Untersuchung zur Wirkung des Anti-Fettsäure bindenden Membranproteins auf die ^{14}C-Ölsäurebindung an microvillöse Membranen des Rattenjejunums	20
2.2.7.	Isolation und Charakterisierung von Rattenhepatozyten	21
2.2.8.	Inkubationsexperimente mit isolierten Rattenhepatozyten	23
2.2.9.	Untersuchungen zum Einfluß des Anti-Fettsäure bindenden Membranproteins auf die hepatozelluläre Aufnahme verschiedener organischer Anionen	24
2.2.10.	Lösung der Membranproteine aus der Lipidmatrix der Rattenleberplasmamembranen, Plazentamembranen und microvillösen Membranen des Rattenjejunums	25
2.2.11.	Affinitätschromatographische Untersuchungen	26
2.2.12.	Charakterisierung der affinitätschromatographisch isolierten Proteine	27
2.2.13.	Präparation von Antikörpern gegen das BSP / Bilirubin- und Fettsäure bindende Membranprotein	29
2.2.14.	Immunhistochemische Untersuchungen	29
3.	Ergebnisse	32
3.1.	Untersuchungen zur Albuminrezeptor-Hypothese	32
3.2.	Physikochemische und immunhistologische Untersuchungen eines BSP / Bilirubin-Bindungsproteins aus Rattenleberplasmamembranen	42
3.3.	Isolation eines BSP / Bilirubin bindenden Membranproteins aus menschlicher Plazenta	55

3.4.	Untersuchungen zur Bindung von Fettsäuren an isolierte Rattenleberplasmamembranen und Isolation eines Fettsäure bindenden Membranproteins	59
3.5.	Untersuchung der Fettsäurebindung an isolierte microvillöse Membranen des Rattenjejunums und Isolation eines Fettsäure bindenden Membranproteins	77
3.6.	Untersuchungen zur Fettsäureaufnahme in isolierte Hepatozyten	96
3.7.	Untersuchungen zur biologischen Signifikanz eines hepatozellulären Fettsäurerezeptors	115
4.	Diskussion	130
5.	Zusammenfassung	142
6.	Literaturverzeichnis	145

1. Einleitung

In der medizinischen Praxis sind Cholestase, Ikterus oder Fettleber häufige klinische Symptome. Obwohl in den meisten Fällen durch die modernen diagnostischen Untersuchungsverfahren (Labor, Endoskopie, Sonographie, Computertomographie) die Ursache solcher Symptome gesichert werden kann, bleiben einige Fälle mit intrahepatischer Cholestase oder mit Hyperbilirubinämie ungeklärt. Der Grund ist die mangelnde Kenntnis der pathophysiologischen bzw. der molekularbiologischen Vorgänge des zellulären Transports und der Gallesekretion der Leber. Zur Klärung dieser Prozesse gewann die Erforschung des hepatozellulären Transports der an Albumin gebundenen organischen Anionen - Gallensäuren, Fettsäuren und Bilirubin - besonderes Interesse. Neben diesen endogenen Substanzen gehören zu der Gruppe organischer Anionen auch bestimmte Medikamente, Hormone, karzinogene Substanzen und zur Diagnostik der Leberfunktion eingesetzte Farbstoffe wie z.B. Bromsulphthalein oder Indozyanin Grün (96). Die Klärung des hepatozellulären Aufnahmemechanismus ist daher von unmittelbarer klinischer Bedeutung.

1.1. Stand der Forschung

Rezeptorabhängige Transportsysteme in der Leberzellmembran nehmen eine bedeutende Rolle bei der Regulierung von Stoffwechselprozessen ein. Während Rezeptoren für Hormone (z.B. Insulin) und Lipoproteine wahrscheinlich sind (25), ist der Aufnahmeprozeß organischer Anionen immer noch kontrovers. Der Transport von Bilirubin, Gallensäuren und Fettsäuren vom Plasma in die Leber stellt eine lebenswichtige Funktion dar, welche bei Leberschädigung oft beeinträchtigt ist. Da diese drei Klassen organischer Anionen trotz ihrer festen Bindung an Serumalbumin rasch und mit hoher Extraktionsrate von der Leber

aufgenommen werden, wurden spezifische Transportmechanismen für diese Substanzen vermutet.
In kinetischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß die hepatozelluläre Aufnahme organischer Anionen nach Dissoziation der Ligand-Albumin Komplexe an oder in der Nähe der Zellmembran erfolgt und Albumin selbst nicht in die Zelle aufgenommen wird (14, 16, 43, 44, 45, 85, 129). Der sich anschließende transmembranöse Transport von Bilirubin, Bromsulphthalein (BSP) und Gallensäuren läuft gegen einen Konzentrationsgradienten ab (7, 29, 126). Allerdings ist sowohl die Konzentration des extrazellulären Serumalbumins als auch seine Affinität für organische Anionen signifikant höher als die der intrazellulären zytosolischen Bindungsproteine (Ligandin (129), zytosolisches Fettsäure bindendes Protein (65), zytosolische Gallensäuren bindende Proteine (115)) (32, 54, 55, 130). Daher muß angenommen werden, daß der gegen einen Konzentrationsgradienten ablaufende Transport durch ein Membranprotein mit höherer Affinität für diese Liganden vermittelt wird.
Rezeptorvermittelte Transportmechanismen sind durch folgende kinetische Phänomene charakterisiert: entsprechend einer Sättigungskinetik ablaufender Transport; selektive kompetetive Hemmbarkeit; Countertransport (d.h. gegen einen Konzentrationsgradienten ablaufender Austritt von intrazellulären Substanzen in den Extrazellulärraum); "Vorladungs-Phänomen" (d.h. die Aufnahmegeschwindigkeit wird durch Vorladen der Zellen mit Substrat beschleunigt) (96).

1.1.1. Hepatozelluläre Aufnahme von Bilirubin und verwandten cholephilen Substanzen

Im Ganztier und der isoliert perfundierten Rattenleber konnte gezeigt werden, daß die hepatozelluläre Aufnahme von Bilirubin und verwandten cholephilen Xenobiotika wie Bromsulphtha-

lein (BSP) und Indozyanin Grün (ICG) entsprechend einer Sättigungskinetik abläuft, gegenseitig kompetitiv hemmbar ist und Merkmale des Countertransportes und des Vorladungsphänomens aufweist (7, 33, 34, 44, 83, 85, 95, 96). Obwohl sich hydrophobes unkonjugiertes Bilirubin sowie hydrophiles Bilirubindiglucuronid, ICG und BSP dasselbe Carriersystem zu teilen scheinen (40), bestehen möglicherweise Unterschiede in ihrem transmembranösen Transportverhalten (40, 72), die bisher noch nicht eindeutig ermittelt wurden. Trotz einiger gemeinsamer Merkmale des Gallensäuren- und Bilirubintransportes (5, 63, 72), wurde in der Mehrzahl der bisher vorliegenden Untersuchungen nachgewiesen, daß diese beiden Klassen organischer Anionen mittels getrennter Carriersysteme in die Leber aufgenommen werden (84, 90, 95). Obwohl eine einzelne Studie die Aufnahme von Bilirubin als einen passiven Diffusionsvorgang deutete (52), sind die oben aufgeführten Beobachtungen mit der Hypothese vereinbar, daß die hepatozelluläre Aufnahme von konjugiertem und unkonjugiertem Bilirubin durch rezeptorvermittelten Transport erfolgt (84, 85, 90, 95, 96).

Der erste Schritt eines jeden rezeptorvermittelten Transportvorganges besteht in der Bindung des Liganden an den Carrier. In verschiedenen Studien wurde die direkte Bindung von BSP und Bilirubin an isolierte Rattenleberplasmamembranen analysiert. Cornelius et al. (23) wiesen als erste sättigungsfähige Membranbindung von BSP nach. Sie beschrieben eine sehr hohe Bindungskapazität von ca. 200 nmol/mg Membranprotein und konnten keine Hemmung der Bindung durch Bilirubin aufzeigen. Tiribelli et al. fanden eine BSP-Membranbindung mit hoher Affinität (K_d = 49 µM) und maximaler Bindungskapazität von 40 nmol/mg, die durch Bilirubin gehemmt werden konnte (119). Untersuchungen von Reichen et al. (92) zeigten sättigungsfähige und reversible Bindung von BSP, die durch Bilirubin und ICG, jedoch nicht durch Gallensäuren hemmbar war. Aufgrund der Computer-

analyse der komplexen Membranbindungskurve konnten drei Klassen von Bindungsstellen identifiziert werden, von welchen eine eine deutlich höhere Affinität ($K_a = 5,5 \times 10^7\ M^{-7}$) für BSP zeigte als die entsprechende BSP-Bindungsstelle des Albuminmoleküls. Viele der offenbar spezifischen Bindungskriterien konnten später allerdings auch mit synthetischen, proteinfreien Lecithin / Cholesterin-Liposomen nachgeahmt werden (130), so daß das BSP-Membranbindungsverhalten als Hinweis für eine spezifische Bindung in Frage gestellt wurde.
Zur weiteren Analyse des Carriersystems für Bilirubin und BSP versuchten drei Gruppen ein spezifisches Bilirubin / BSP bindendes Membranprotein darzustellen. Reichen und Berk isolierten mit Hilfe der Affinitätschromatographie über Bilirubin- und BSP-Agarose ein 60.000 Dalton Protein (91). Wolkoff und Chung beschrieben ein organische Anionen bindendes Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 55.000 Dalton (131). Auch Tiribelli und Mitarbeiter berichteten über ein BSP bindendes Membranprotein ("Bilitranslocase") (120). In nativer Form hatte dieses Protein ein Molekulargewicht von 100.000 Dalton, welches aus zwei nicht identischen Untereinheiten (α: 37.000, ß: 35.000 Dalton /α_2ß) zusammengesetzt war (68). Seine Wasserlöslichkeit und hohe Bindungskapazität (17 Bindungsstellen / Molekül) sind jedoch ungewöhnlich für ein Membranprotein, das als Bestandteil eines Carriersystems mit nur geringer Transportkapazität angesehen wird.

1.1.2. Hepatozelluläre Aufnahme von Gallensäuren

Die hepatozelluläre Aufnahme von Gallensäuren zeigte ebenfalls kinetische Merkmale für einen rezeptorvermittelten aktiven Transport (29, 33, 97). Untersuchungen mit isolierten Leber-

plasmamembranen wiesen spezifische Membranbindung von Gallensäuren nach (3). Kürzlich wurden verschiedene Membranproteine mit hoher Affinität für Gallensäuren mittels Photoaffinitätsmarkierung identifiziert (20, 60, 122), und Levy und Mitarbeiter konnten ein einzelnes 54.000 Dalton Gallensäuren bindendes Membranprotein isolieren (66). In vorläufigen Untersuchungen gelang es durch Implantation dieses Proteins in synthetische Liposomen, den Gallensäurentransport im Modell zu rekonstituieren (66). Die Bedeutung von zwei kürzlich identifizierten, intrazellulären, zytosolischen Gallensäuren bindenden Proteinen (115) im hepatozellulären Aufnahmeprozeß ist noch unbekannt.

1.1.3. Hepatozelluläre Aufnahme von Fettsäuren

Entgegen der weitverbreiteten Meinung, daß die Aufnahme von Fettsäuren in die Leberzelle durch passive Diffusion erfolgt (47, 61, 106) weisen einige kinetische Untersuchungen darauf hin, daß zumindest ein Teil der hepatozellulären Fettsäureaufnahme durch einen spezifischen Transportmechanismus vermittelt wird. Samuel et al. (93) und Paris et al. (81) fanden in ihren Untersuchungen an embryonalen Herzzellen des Huhnes bereits Hinweise dafür, daß die zelluläre Fettsäureaufnahme einer Sättigungskinetik entspricht. Abumbrad und Mitarbeiter (1, 2) berichteten, daß der Einstrom von Fettsäuren in Adipozyten sättigungsfähig ist und durch Phloretin, ein Inhibitor zellulärer Transportprozesse, aufgehoben werden kann. Mahadevan und Sauer (71) fanden in Trypsin vorbehandelten Hepatozyten eine Hemmung der Fettsäureoxidation. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stellten De Grella und Light (26, 27) die Annahme

eines aktiven Transportmechanismus für Fettsäuren in Frage und schrieben die sättigungsfähige Aufnahmekomponente in den vorangegangenen Untersuchungen dem intrazellulären Fettsäurestoffwechsel zu.
Vereinbar mit einem rezeptorvermittelten Aufnahmemechanismus sind Beobachtungen über die zelluläre Regulation der Fettsäureaufnahme entsprechend dem Ernährungszustand (78), der Plasmakonzentration der Sexualhormone (22) und nach Gabe von Clofibrat (79). Auch kann die sehr schnelle und effektive Aufnahme von Fettsäuren aus dem Plasma in die Leber (89) unter Berücksichtigung der nur sehr langsamen Dissoziationsrate des Fettsäure-Albumin Komplexes (62) nicht durch einfache Diffusion erklärt werden.

1.1.4. Die Albuminrezeptor-Hypothese

Das konventionelle Konzept der zellulären Aufnahme von organischen Anionen geht von folgenden zwei Voraussetzungen aus: 1. Das Gleichgewicht zwischen freien Liganden und Ligand-Albumin Komplexen stellt sich unmittelbar ein. 2. Nur der ungebundene Ligand an der Oberfläche der Hepatozyten steht zur Aufnahme zur Verfügung. Diese Voraussetzungen sind kürzlich in Frage gestellt worden. Die unidirektionalen Dissoziationsraten von Albuminkomplexen mit Bilirubin und Fettsäuren sind sehr langsam (30, 46, 98, 116). Sie sind bedeutend zu langsam, um die beobachteten hohen Extraktionsraten dieser Liganden nach nur einfachem Durchfluß durch die isoliert perfundierte Rattenleber zu erklären (6, 43, 85, 129). Da Albumin nicht zusammen mit seinem Liganden in die Leberzelle aufgenommen wird, muß die Dissoziation der Albumin-Ligand Komplexe an oder in der Nähe der hepatozellulären Membran in vivo sehr viel schneller erfolgen, als von den Modellösungen in vitro vorhergesagt

ist. Der sich dahinter verbergende Mechanismus ist unklar. Baker und Bradley (6) und Bloomer et al. (16) spekulierten, daß spezifische Makromoleküle auf der Leberzellplasmamembran eine schnellere Dissoziation der Ligand-Albumin Komplexe bewirken und somit die zelluläre Aufnahme der Liganden beschleunigen. Auf der Grundlage kinetischer Untersuchungen zur Analyse der Ölsäure-, BSP- und Bilirubin-Aufnahme in Abhängigkeit von der Albuminkonzentration vermuteten Weisiger, Gollan und Ockner, daß ein spezifischer hepatozellulärer Rezeptor für Albumin die Dissoziation der Albumin-Ligand Komplexe und anschließende Aufnahme der Liganden in die Leber bewerkstelligt (123, 124). Dieser vermutete Albuminrezeptor unterscheidet sich in seinen Merkmalen und seiner Funktion deutlich von dem hepatozellulären Rezeptor für polymerisiertes Albumin, welcher bei der Infektion des Hepatitis B-Virus von Bedeutung zu sein scheint (118). In anderen Untersuchungen wurde auch ohne die Postulierung eines spezifischen Albuminrezeptors nachgewiesen, daß die Dissoziation der Albumin-Ligand Komplexe sehr rasch erfolgt (37, 125). Der genaue Mechanismus dieser beschleunigten Dissoziation ist jedoch noch unbekannt.

1.1.5. Offene Fragen zur zellulären Aufnahme organischer Anionen

Der hepatozelluläre Aufnahmemechanismus organischer Anionen ist noch weitgehend unklar. Aufgrund der Mehrzahl der kinetischen Untersuchungen wird ein aktiver Transport von Bilirubin und verwandten amphipathischen Anionen, wie BSP und ICG, angenommen. Allerdings konnte ein in direkten Untersuchungen mit isolierten Rattenleberplasmamembranen als spezifisch angesehenes Bindungsverhalten auch mit synthetisch hergestellten, proteinfreien Liposomen aufgezeigt werden. Die Unsicher-

heit über den zellulären Aufnahmemechanismus dieser organischen Anionen wurde noch dadurch verstärkt, daß drei verschiedene Arbeitsgruppen über die Isolation unterschiedlicher potentieller Rezeptorproteine berichteten.

Die hepatozelluläre Aufnahme von Gallensäuren erfolgt durch einen aktiven Transportprozeß. In Untersuchungen mit isolierten Rattenleberplasmamembranen konnte spezifisches Bindungsverhalten mit hoher Affinität für Membranbindungsstellen nachgewiesen werden und es gelang, ein spezifisches Gallensäuren bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 54.000 Dalton zu isolieren.

Die Aufnahme von Fettsäuren ist besonders kontrovers. Der allgemeinen Annahme eines passiven Diffusionsvorganges steht die nur sehr langsame Dissoziationsrate des Fettsäure-Serumalbumin Komplexes und die im Vergleich dazu sehr hohe Extraktionsrate durch die Leber entgegen. Auch ist die Regulation der zellulären Fettsäureaufnahme durch Ernährungsfaktoren, Hormone und Medikamente nicht durch einfache Diffusion zu erklären. Einige wenige Untersuchungsergebnisse, die mit einem spezifischen Aufnahmemechanismus vereinbar wären, wurden von anderen Untersuchern als Ausdruck des intrazellulären Fettsäurestoffwechsels interpretiert.

Da alle organischen Anionen im Serum fest an Albumin gebunden transportiert werden und Albumin selbst nicht mit in die Leber aufgenommen wird, ist eine beschleunigte Dissoziation dieser Albumin-Ligand Komplexe an oder in Nähe der Leberzellplasmamembran zu fordern. Die Hypothese eines spezifischen hepatozellulären Albuminrezeptors bleibt noch zu bestätigen.

1.2. Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit befaßt sich mit folgenden Problemen:

1. Untersuchungen zur Albuminrezeptor-Hypothese

2. Physikochemische und immunhistologische Untersuchungen eines BSP / Bilirubin bindenden Proteins aus Rattenleberplasmamembranen

3. Isolation eines BSP / Bilirubin bindenden Membranproteins aus menschlicher Plazenta

4. Untersuchung der Fettsäurebindung an isolierte Rattenleberplasmamembranen und Isolation eines spezifischen Fettsäure bindenden Membranproteins

5. Untersuchung der Fettsäurebindung an microvillöse Membranen des Rattenjejunums und Isolation eines spezifischen Fettsäure bindenden Membranproteins

6. Analyse der Fettsäureaufnahme in isolierte Hepatozyten

7. Untersuchungen zur biologischen Signifikanz eines hepatozellulären Fettsäurerezeptors

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

^{125}Jod (17 Ci/mg), ^{14}C-Ölsäure (900 mCi/mmol), ^{14}C-Arachidonsäure (400 mCi/mmol), ^{14}C-Palmitinsäure (600 mCi/mmol), ^{14}C-Linolensäure (600 mCi/mmol), ^{14}C-Taurocholsäure (40,3 mCi/mmol), ^{14}C-L-α-I-Palmitoyl, 2-Oleyl Phosphatidylcholin (57,0 mCi/mmol), ^{14}C-Ölsäure-Cholesterinester (56,6 mCi/mmol), Aquasol, Protosol und Econofluor von New England Nuclear;

^{35}S-Bromsulphthalein (BSP) (100 mCi/mmol) und ^{14}C-Bilirubin (15,9 mCi/mmol) von Amersham;

^{125}J-Humanalbumin (1 mCi/mmol) von Malinckrodt;

Unmarkierte Ölsäure, Taurocholsäure, BSP, Bilirubin, Rinderserumalbumin (Fraktion V), Rattenserumalbumin, ß-Lactoglobulin, Trypsin, Phospholipase A_2, Phospholipase C, Collagenase (Typ IV), 1-Äthyl-3 (3 Dimethylaminopropyl)carbodiimid und Triton X-100 von Sigma;

Sephadex G-100, G-150, Sepharose 4B, Sepharose 6B, AH-Sepharose 4B, CNBr-Sepharose 4B und Molekulargewichtsstandardproteine für die Gelchromatographie von Pharmacia;

FITC, gebunden an Schweine Anti-Kaninchen Antiserum von DACO;

Ziegen Anti-Humanalbumin und Kaninchen Anti-Rattenalbumin, Kaninchen Anti-Rattenserumproteine und Anti-Rattentransferrin von Cappel-Laboratories;

Ziegen Anti-Rattenfibronectin und Trypsin-Inhibitor von Cal-

biochem-Behring;

Bio Bead SM2, Molekulargewichtsstandardproteine für die SDS-Elektrophorese, SDS, Acrylamid, BIS und DTT von Bio Rad;

Anti-Rattenligandin: Geschenk von Dr. Wolkoff, Albert Einstein College of Medicine, New York, USA;

^{125}J-Schweineinsulin (67,5 µCi/µg): Geschenk von Dr. Rayfield, Mount Sinai School of Medicine, New York, USA;

^{125}J-LDL (112 µCi/µg): Geschenk von Dr. Ginsberg; Mount Sinai School of Medicine, New York, USA.

Alle übrigen Chemikalien wurden von Merck-Schuchardt bezogen.

2.2. Methoden

2.2.1. Präparation und Analyse von Rattenleberplasmamembranen

Rattenleberplasmamembranen mit überwiegend sinusoidalen Bestandteilen wurden nach einer früher veröffentlichten Modifikation (92) etablierter Methoden präpariert. 10 Sprague-Dawley Ratten (160-170 g Körpergewicht) wurden pro Plasmamembranpräparation verarbeitet. 3 - 4 dieser Präparationen wurden vereinigt und nach der Proteinbestimmung (67) in Aliquots zu je 5 oder 10 mg Membranprotein geteilt. Diese wurden bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Rattenlebermikrosomen (99) und Mitochondrien (101) wurden wie früher beschrieben präpariert. Die Untersuchung der Rattenleberplasmamembranfraktionen auf Reinheit und Kontamination mit anderen Zellorganellen erfolgte durch Elektronenmikroskopie (9). und Markerenzymbestimmungen. Dabei wurde die 5'Nucleotidase

als genereller Marker für Plasmamembranen (75), die Glucagon-stimulierbare Adenylatzyklase (128) als Bestandteil der sinusoidalen Region der Leberplasmamembranen, die Glucose-6-Phosphatase (50) als Marker für Mikrosomen und die Succinat-Dehydrogenase (82) für Mitochondrien untersucht. Rattenerythrozytenmembranen (73) und hitzedenaturierte (4 Std. bei 70°C) Rattenleberplasmamembranen dienten als Kontrollpräparationen.

Enzymatische Verdauung der Membranen

Leberplasmamembran-Aliquots (5 mg Protein) wurden für 30 Minuten bei 37°C mit einem der folgenden Enzyme inkubiert: 110 U BAEE Trypsin mit und ohne Überschuß von Trypsin-Inhibitor, 2 U Phospholipase C, 2 U Neuraminidase, alle in 10 mM Mononatrium / Dinatrium Phosphatpuffer (pH 7,6), 8,1 U Phospholipase A_2 in 10 mM Tris-Maleat Puffer (pH 7,4).

2.2.2. Inkubationsexperimente mit Rattenleberplasmamembranen

2.2.2.1. Inkubation von ^{125}J-markiertem Rattenalbumin

Rattenalbumin wurde mit ^{125}J in einem molaren Verhältnis von 0,3 - 1,0 mol ^{125}J/mol Albumin markiert (74). Um Denaturierung des Albumins zu vermeiden, wurde die Jodierungsreaktion mit Tyrosin anstatt Natriummetabisulfit gestoppt. Markiertes Protein wurde anschließend von freiem Jod durch Gel-

filtration über Sephadex G-25 getrennt und in einem weiteren Reinigungsschritt wurden vorhandene Aggregate über eine Gelfiltrationssäule mit Sephadex G-100 entfernt. Restliches denaturiertes Albumin, welches unspezifisch an Inkubationsröhrchen, Pipetten und Filter ebenso wie an Leberplasmamembranen gebunden war, wurde durch folgende Präinkubationsmethode fast vollständig entfernt: Leberplasmamembranen (10 mg Protein) wurden in 1 ml 1 mM $NaHCO_3$-Puffer (pH 7,6) mit 50 µl der markierten Albuminlösung mit bekannter spezifischer Aktivität in einem 3 ml Polypropylenröhrchen für 30 min bei 4°C rotierend inkubiert. Die Membransuspension wurde dann 15 min bei 12.000 g zentrifugiert und 1 ml des Überstands als Albuminsubstrat in dem folgenden Bindungsexperiment verwendet. Diese Präparation konnte als einzelne Bande mit einem Molekulargewicht von 67.000 von einer Sephadex G-100 Säule eluiert werden und war zu 97-99 % mit einem Kaninchenantikörper gegen Rattenalbumin präzipitierbar. Neben dem verwendeten Bicarbonatpuffer wurde auch ein 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,5) mit 25 mM NaCl und 1 mM CaCl eingesetzt. Für manche Inkubationsexperimente wurde das Albumin vor der Jodination entfettet (19).

Rattenleberplasmamembransedimente (0,2-10 mg Protein) wurden in 1 ml des Präinkubationsüberstandes mit einer definierten ^{125}J-markierten Albuminmenge (s.o.) resuspendiert und für 30 min equilibriert. Die meisten Inkubationen wurden bei 4°C durchgeführt, einige jedoch auch bei 22°C und 37°C. Am Ende der Inkubationsperiode wurde die Bindung aus der Verteilung der Radioaktivität zwischen Membransediment und Überstand nach einer anfänglichen Zentrifugation (15 min bei 12.000 g) und mehreren Waschungen mit 1 mM $NaHCO_3$-Puffer (pH 7,6) bestimmt.

Einfluß von ultravioletter Bestrahlung auf die Albuminbindung (Photoaffinitätsprobe)

Um sicherzustellen, daß spezifisch gebundenes Albumin nicht während des Zentrifugationsvorganges von dem postulierten Rezeptor dissoziiert, wurden zusätzliche Untersuchungen unter einer Bestrahlung mit 254 nm UV-Licht in einer Entfernung von 2 cm über einen Zeitraum von 6 min im Eisbad durchgeführt. Vorher wurde in Vergleichsuntersuchungen die Effektivität der UV-Bindungsreaktion geprüft. Dazu wurden 6 mg Ziegen-Antihumanalbumin, gebunden an CNBr-aktivierte Sepharose 4B (87), mit ^{125}J-markiertem Humanalbumin mit und ohne UV-Bestrahlung inkubiert. Die Gele wurden dann in kleinen, adaptierbaren Säulen (Durchmesser 10 mm) mit 0,15 M NaCl in 0,02 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,6) gewaschen bis kein ^{125}J-markiertes Albumin mehr im Eluat erschien und anschließend mit 8 M Harnstoff eluiert.

2.2.2.2. Inkubation der Leberplasmamembranen mit ^{125}J-markiertem Schweineinsulin und ^{125}J-markiertem Low Density Lipoprotein (LDL)

Gereinigtes, unmarkiertes und ^{125}J-markiertes Schweineinsulin wurde in verschiedenen Konzentrationen mit 2 mg Leberplasmamembranprotein inkubiert. Ein 40 mM NaCl/1,7 mM KCl/0,4 mM $MgSO_4$/0,4 mM KH_2PO_4-Puffer (pH 7,5) mit 1 % Serumalbumin (Rind) (38) wurde in einem Inkubationsvolumen von 1 ml verwendet. Unspezifische Bindung oder Präzipitation von ^{125}J-markiertem Insulin wurde durch dieselbe Präinkubationsmethode wie bei den Inkubationsversuchen mit ^{125}J-markiertem

Albumin vermieden. Ähnliche Untersuchungen wurden mit ^{125}J-markiertem menschlichen LDL durchgeführt. Die Inkubationen, Zentrifugation und Waschung der Sedimente waren identisch mit dem für die Albumininkubation verwendeten Verfahren.

2.2.2.3. Inkubation von ^{14}C-Ölsäure mit Rattenleberplasmamembranen

^{14}C-Ölsäure (900 mCi/mmol) wurde mit definierten Mengen nicht radioaktiver Ölsäure (gelöst in Chloroform) versetzt, unter Stickstoff getrocknet und in 0,2 ml 0,1 N NaOH bei 37°C gelöst. Nach Zufügen von 0,15 M NaCl/0,02 M-Phosphatpuffer (PBS) und Einstellung des pH-Wertes auf 7,6 wurde die Lösung als solche verwandt oder Rattenalbumin bzw. ß-Lactoglobulin zugesetzt. Dazu wurden die hinzugefügten Bindungsproteine vorher entfettet (19) und so mit ^{14}C-Ölsäure gemischt, daß das molare Verhältnis von Ölsäure zu Protein zwischen 0,25 : 1 bis 10 : 1 variierte. In typischen Inkubationsexperimenten wurden Leberplasmamembran-Aliquots (5 mg Protein) aufgetaut, zentrifugiert (15 min, 15.000 g) und in der entsprechenden ^{14}C-Ölsäurepräparation, die 0,02 - 2,5 nmol Ölsäure mit oder ohne Albumin bzw. ß-Lactoglobulin enthielten, resuspendiert. Die Inkubationsvolumina betrugen 1-4 ml. Die Inkubationen wurden für 30 min bei Raumtemperatur oder 37°C durchgeführt, nachdem Vorinkubationen gezeigt hatten, daß die Bindung nach 30 min ein Gleichgewicht erreicht hatte. Die Bindung von ^{14}C-Ölsäure wurde entsprechend der oben erwähnten Zentrifugations-Bindungsanalyse (2.2.2.1.) durchgeführt. Aus der Radioaktivität im Sediment nach der 3. Rezentrifugation wurde die Menge der an die Leberplasmamembranen gebundenen Ölsäure berechnet. Die Messung der in Aquasol suspendierten Radioak-

tivität erfolgte im Szintillationszähler (Mark III, Traycor Analytic) mit einer Ausbeute von 92 %. In Inkubationsexperimenten mit Albumin und ß-Lactoglobulin wurde die im Gleichgewicht vorhandene Konzentration von freier Fettsäure mittels der schrittweisen Gleichgewichtsbindungskonstanten beider Proteine (104, 105) berechnet (133).

2.2.2.4. Inkubation von ^{35}S-BSP, ^{14}C-Bilirubin und ^{14}C-Taurocholsäure mit Rattenleberplasmamembranen

Aliquots von 5 mg Membranprotein wurden für 30 min bei Raumtemperatur oder 37°C in 1 ml PBS, pH 7,6 mit ansteigenden Konzentrationen von ^{14}C-Taurocholsäure, ^{14}C-Bilirubin und ^{35}S-BSP (in definierten molaren Verhältnissen an BSA gebunden) inkubiert. Die Membranbindung dieser Liganden wurde entsprechend der oben beschriebenen Zentrifugations-Bindungsanalyse bestimmt.

2.2.2.5. Untersuchungen zur Wirkung der Antikörper gegen das BSP / Bilirubin- und Fettsäure bindende Membranprotein auf die Bindung organischer Anionen an Rattenleberplasmamembranen

Aliquots der IgG-Fraktionen der Kaninchenantiseren gegen beide Membranproteine bzw. des Anti-Rattenfibronectins als Kontrollantikörper wurden mit ansteigenden Mengen Rattenleberplasmamembranen (0,625-10 mg Protein) in 1 ml PBS, pH 7,6, für 30 oder 60 min bei 37°C inkubiert. Die zur Sättigung der jeweils inkubierten Membranmengen benötigte Konzentration

von ^{14}C-Bilirubin, ^{35}S-BSP, ^{14}C-Taurocholsäure und ^{14}C-Ölsäure wurde hinzugefügt und für weitere 30 min inkubiert. Für die Inkubationsexperimente mit ^{14}C-Ölsäure wurden auch hitzedenaturierte Leberplasmamembranen verwendet, um den Einfluß des Antikörpers auf die spezifische und unspezifische Bindung zu bestimmen. Die membrangebundene Radioaktivität wurde, wie oben beschrieben, gemessen.

2.2.3. Präparation und Analyse von Plasmamembranen der menschlichen Plazenta

Die Präparation der Plazenta-Plasmamembranen erfolgte nach einer Modifikation der Methode von Balfour und Jones (7). Zunächst wurde das frische Plazentagewebe von den Eihäuten und groben Bindegewebszügen befreit, auf Filtern getrocknet und 100 g abgewogen. Nach sechsmaligem Waschen in kalter 0,9 %-iger NaCl wurde das Gewebe in kleine Stücke zerschnitten und in 100 ml 5 mM EDTA-Puffer, pH 7,8, überführt. Nach 2 1/2-minütiger Homogenisation im Waring-Mixer (max. Geschwindigkeit) wurde das Homogenat durch 4 Mullagen gefiltert. Nach weiterem Zufügen von 200 ml 5 mM EDTA-Puffer und erneuter Homogenisation mit 3 Auf- und Abbewegungen im motorbetriebenen Braun-Homogenisator wurde das Homogenat für 30 min bei 600 g und der Überstand danach für 30 min bei 100.000 g zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde in EDTA-Puffer resuspendiert und erneut 30 min bei 100.000 g zentrifugiert. Nach Waschen und Rezentrifugation des Sedimentes wurde es in wenig 1 mM $NaHCO_3$-Puffer, pH 7,6, aufgenommen und bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt. Mikrosomen (99) und Mitochondrien (101) dienten als Kontrollmembran-

branpräparationen. Die Charakterisierung der Membranen erfolgte wie für die Rattenleberplasmamembranen beschrieben (s. 2.2.1.).

2.2.4. Präparation und Analyse von microvillösen Membranen des Rattenjejunums

Microvillöse Membranen des Rattenjejunums wurden nach einer Modifikation der Ca^{2+}-Präzipitationsmethode präpariert (56, 100). Nach einer nächtlichen Hungerperiode wurden 3 Sprague-Dawley Ratten getötet, der gesamte Dünndarm herauspräpariert und in 3 Abschnitte (Duodenum, Jejunum und Ileum) geteilt. Das Lumen wurde durch einen longitudinalen Schnitt eröffnet, die Mukosa herauspräpariert und mit 300 ml 500 mM Mannitol, 2 mM Tris-Hepes (pH 7,5) versetzt. Nach 2 1/2-minütiger Homogenisation in einem Waring-Mixer wurden 0,44 g $CaCl_2 \times 2\ H_2O$ hinzugefügt und die Suspension nach Rühren für 15 min auf Eis stehengelassen. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 15.000 rpm im SS 34-Rotor (Sorvall-Kühlzentrifuge) wurde das Sediment in 80 ml 100 mM Mannitol, 1 mM Tris-Hepes (pH 7,5) resuspendiert und erneut 30 min auf Eis stehengelassen. Anschließend wurde die Präparation für 30 min bei 15.000 rpm zentrifugiert, die Sedimente in 0,013 M Tris (pH 7,5) vereinigt und bis zum endgültigen Gebrauch bei -80°C gelagert.

In der isolierten microvillösen Membranfraktion wurden folgende Enzymaktivitäten bestimmt: Saccharase als spezifischer Marker für microvillöse Membranen (39); 5'-Nucleotidase als generelles Leitenzym für Plasmamembranen (75); Glukose-6-Phosphatase als mikrosomales Leitenzym (50); Succinat-Dehydrogenase als typisches mitochondriales Enzym (82). Phos-

phor wurde nach der Methode von Bartlett (8) und Proteine nach Lowry et al. (67) bestimmt.

2.2.5. Inkubation von ^{14}C-Ölsäure mit microvillösen Membranen des Rattenjejunums

^{14}C-Ölsäure (900 mCi/mmol) wurde mit bestimmten Anteilen nicht radioaktiver Ölsäure (gelöst in Chloroform) versetzt, unter Stickstoff getrocknet und in 0,2 ml 0,1 N NaOH bei 37°C gelöst. Nach Zufügen von PBS und Einstellung des pH-Wertes auf 7,6 wurde die Lösung als solche verwandt oder entfettetes Albumin (BSA) in molaren Verhältnissen von 1 : 10 bis 1 : 0,25 (Albumin : Ölsäure) hinzugefügt. Die jeweils frisch hergestellten Ölsäurelösungen waren klar, ohne Anzeichen einer Trübung oder Präzipitation.
Die Inkubationen wurden in Polypropylenröhrchen in einem Volumen von 440 µl PBS, pH 7,6, mit ^{14}C-Ölsäure (0,100-4,500 µM), entweder allein oder in verschiedenen molaren Verhältnissen an Albumin gebunden, und 100 µg Membranproteinaliquots durchgeführt. Hitzedenaturierte microvillöse Membranen wurden durch 16-stündige Inkubation bei 45°C präpariert. Die Membranbindungsuntersuchungen beinhalteten: Zeitverlauf des Bindungsverhaltens; Bestimmung des Temperaturoptimums durch Inkubation bei 4°C, 23°C und 37°C; pH-Abhängigkeit durch Variation des pH-Wertes im Inkubationsmedium zwischen 2,0 - 9,0 mit einem Zitrat-Phosphat-Borat / HCl-Puffersystem (117). Der Einfluß von Trypsin auf die ^{14}C-Ölsäurebindung wurde durch Präinkubation von 100 µg Membranaliquots (20 µl) mit 200 µl einer Trypsinlösung (0,148 mg/ml) in 1 mM Tris / HCl-Puffer, pH 8,0, für 2 Stunden bei 37°C und nachfolgende In-

kubation mit 200 µl (1 nmol) ^{14}C-Ölsäure frei in wässriger Lösung bei pH 8 und pH 4 untersucht.
In Vergleichsuntersuchungen wurde die Bindung von 0,4 - 9 µM ^{35}S-BSP und 0,5 - 230 µM ^{14}C-Taurocholsäure an Aliquots von 0,1 mg Membranprotein bei 37°C analysiert.

Die Bindung der Liganden an die microvillösen Membranen wurde mit einer Vakuumfiltrationsmethode bestimmt (92). 0,2 ml der Inkubationsgemische wurden auf Whatmann GF / C Glasfilter (24 mm Durchmesser) pipettiert, mit einem Vakuumfiltrationssystem (Hoefer Scientific) filtriert und anschließend mit 20 ml kalter PBS gewaschen. Danach wurden die Filter in Szintillationsgläschen überführt, 10 ml Econofluor hinzugefügt und die Radioaktivität in einem Packard Szintillationszähler (Modell 3380) mit einer Zählausbeute von 92 % gemessen. Die unspezifische Bindung von Radioaktivität an die Filter betrug für die einzelnen Liganden 0,2 - 4 % und wurde jeweils von der Gesamtradioaktivität im Filter abgezogen. Um sicherzustellen, daß keine signifikanten Mengen der Membranen durch die Vakuumfiltration verloren gehen, wurden Aliquots von 100 µg Membranprotein filtriert, mit 20 ml PBS gewaschen und anschließend die auf dem Filter zurückgehaltene Proteinmenge bestimmt. Diese war identisch mit der aufgetragenen Proteinmenge (0,1 $\pm$ 0,07 mg) und betrug sogar nach Trypsinverdauung der microvillösen Membranen noch über 90 %.

2.2.6. Untersuchung zur Wirkung des Anti-Fettsäure bindenden Membranproteins auf die ^{14}C-Ölsäurebindung an microvillöse Membranen des Rattenjejunums

Aliquots von 0,1 mg Membranprotein wurden in 240 µl PBS für 1 Stunde bei 37°C mit ansteigenden Konzentrationen der IgG-Fraktionen (2 mg/ml) des Kaninchen Anti-Fettsäure bindenden Membranproteins der Rattenleber (112) oder des Anti-Rattenfibronectins als Kontrolle inkubiert. Danach wurden 200 µl (1 nmol) ^{14}C-Ölsäure : Albumin (1 : 1) hinzugefügt und für weitere 5 min inkubiert. Zusätzlich wurde der Einfluß der Antikörper auf die unspezifische ^{14}C-Ölsäurebindung an hitzedenaturierte microvillöse Membranen untersucht. Die membrangebundene Radioaktivität wurde, wie unter 2.2.5. beschrieben, gemessen.

2.2.7. Isolation und Charakterisierung von Rattenhepatozyten

Einzelzellsuspensionen isolierter Leberzellen wurden nach einer Modifikation der Methode von Berry und Friend (15) präpariert. Männliche Wistar Ratten (280-300 g) wurden mit Pentobarbital (50 mg/kg) i.p. anästhesiert, die Bauchhöhle wurde eröffnet und die Portalvene kanüliert. Nach Durchtrennung der abdominellen Vena cava unterhalb der Nierenvene wurde die Perfusion mit Calcium-freiem Medium begonnen. In 1 l Medium waren 8 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,2 g $MgSO_4$ x 7 H_2O, 0,06 g KH_2PO_4, 1 g Glukose, 5 mM Hepes und 0,12 g Na_2HPO_4 x 12 H_2O enthalten. Nach Oxigenierung mit 100 % O_2 (5 min, 37°C) und Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 wurde das Medium durch einen 7 Meter langen Silastikschlauch, der in einem auf 37°C temperierten und mit O_2 durchblasenen Wasserbad lag, zur Leber gepumpt. Bei einem hydrostatischen Druck von 18 cm H_2O betrug die Flußrate 30 ml/min. Unmittelbar nach Anschluß der Perfusion wurde die abdominelle Vena

cava oberhalb der Nierenarterien abgebunden. Nach Perfusion mit ca. 500 ml des Calcium-freien Mediums begann die Rezirkulation mit Collagenase (150 mg) in 200 ml Calcium enthaltendem (54 mg $CaCl_2 \times H_2O$) Medium. Nach 15 min wurde die Leber aus dem Situs herauspräpariert, zerkleinert und für 5 min in einem Erlemeyerkolben mit Collagenase und Calcium enthaltendem Medium im vorsichtig schüttelnden Wasserbad bei 37°C weiter inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf Eis gekühlt, durch ein Nylonsieb mit 30 µm großen Poren filtriert, zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in Calcium enthaltendem Medium vorsichtig resuspendiert. Nach 3-maliger Wiederholung der Waschung wurden die Hepatozyten erneut filtriert und dann bis zum Gebrauch (max. 2 Stunden) in einer Verdünnung von 2×10^6 Zellen / ml auf Eis gelagert.

Die Intaktheit der isolierten Hepatozyten wurde vor und nach jedem Experiment untersucht. Die Fähigkeit, Trypan Blau auszuschließen, wurde durch die 5-minütige Inkubation von 0,2 mg der Zellen mit 0,2 ml Trypan Blau (0,4 %) in 1,6 ml des Calcium enthaltenden Mediums bestimmt. Danach wurde in einer Neubauerkammer die Zahl der Zellen, die Trypan aufnehmen, gezählt. Wenn mehr als 90 % der Zellen den Farbstoff ausschlossen, wurde diese Präparation für die nachfolgende Inkubation verwendet. Zusätzliche Kriterien für die Intaktheit der isolierten Zellen waren eine intrazelluläre Kaliumkonzentration von über 85 mM, weniger als 15 %-iger Verlust der Lactat-Dehydrogenase und weniger als 20 %-ige Stimulation der Respiration durch Succinat.

2.2.8. Inkubationsexperimente mit isolierten Rattenhepatozyten

Die Präparation der ^{14}C-Ölsäurelösungen erfolgte wie unter 2.2.5. beschrieben. 50-250 µl Aliquots der Hepatozytensuspension (2 x 10^6 Zellen/ml) wurden mit 0,96 - 173 µM ^{14}C-Ölsäure, entweder alleine oder in molaren Verhältnissen von 1 : 5 bis 1 : 0,5 an Albumin (BSA) gebunden, in einem Volumen von 1 ml PBS, pH 7,4, in Polypropylenröhrchen inkubiert. Untersucht wurde: die Zeitabhängigkeit der Fettsäureaufnahme; die Sättigungsfähigkeit der initialen Aufnahme als eine Funktion der extrazellulären Fettsäurekonzentration im Medium; die Reversibilität der initialen Aufnahme durch Postinkubation in Gegenwart eines Überschusses von Albumin (BSA); die Spezifität der initialen Aufnahme in Gegenwart ansteigender Konzentrationen verschiedener organischer Anionen (BSP, Taurocholsäure, Cholsäure); die Temperaturabhängigkeit (4°C, 16°C, 37°C), pH-Abhängigkeit (Variation des pH-Wertes im Inkubationssystem zwischen 6,0-8,1 mit einem Phosphat-Soerensen-Puffersystem (103)) und der Einfluß verschiedener Na^+- und Ca^{2+}-Konzentrationen im Inkubationsmedium; die Wirkung von Phloretin, Ouabain und verschiedener metabolischer Inhibitoren auf die ^{14}C-Ölsäureaufnahme. Der Einfluß der Trypsinverdauung auf die Aufnahme von Fettsäuren wurde nach Präinkubation von 0,6 mg Trypsin mit 2 ml der Hepatozytensuspension (2 x 10^6 Zellen/ml) in 10 mM Tris / HCl, pH 8,0, bei 37°C untersucht. Die Kontrollpräparation wurde in 10 mM Tris / HCl, pH 8,0, ohne Trypsin inkubiert. Nach 3-maligem Waschen der Zellen in PBS und Resuspension auf 2 x 10^6 Zellen/ml wurden die vorbehandelten Präparationen wie oben beschrieben mit ^{14}C-Ölsäure inkubiert.
Die Bestimmung der in die Leberzellen aufgenommenen Radioaktivität erfolgte nach Vakuumfiltration der Proben (92).

Nach bestimmten Zeitintervallen wurde der zelluläre Aufnahmeprozeß durch Zufügen von 200 µM Phloretin / 0,1 % BSA in PBS, pH 7,4, gestoppt, die Proben in die Mitte des Whatmann GF / C Filters (24 mm Durchmesser) pipettiert und sofort unter Vakuum (50 mm Hg) filtriert. Nach Waschung mit 5 ml der Stopplösung und 20 ml PBS wurden die Filter in Szintillationsgefäße überführt, für 16 Stunden in 1 ml Protosol belassen und anschließend 10 ml Econofluor hinzugefügt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mit einer 92 %-igen Ausbeute in einem Packard Tri-Carb Flüssigkeitsszintillationszähler (Modell 3380). Die unspezifische Absorption von Radioaktivität an die Filter in Abwesenheit von Zellen betrug, je nach inkubierter Fettsäurelösung, 1 - 4 % und wurde jeweils von der Gesamtradioaktivität in Gegenwart von Zellen abgezogen.

2.2.9. Untersuchungen zum Einfluß des Anti-Fettsäure bindenden Membranproteins auf die hepatozelluläre Aufnahme verschiedener organischer Anionen

Isolierte Hepatozyten wurden mit der IgG-Fraktion eines Kaninchenantiserums gegen das Fettsäure bindende Membranprotein (112) (s. 2.2.13.) und als Kontrolle mit der IgG-Fraktion des Kaninchenpräimmunserums bzw. des Ziegen Anti-Rattenfibronectins vorbehandelt. Dazu wurden 2 ml der Hepatozytensuspension (2×10^6 Zellen / ml) mit 100-800 µg der IgG-Fraktionen in 3 ml des Calciums enthaltenden Perfusionsmediums (s. 2.2.7.) für 1 Stunde bei 4°C im vorsichtig rotierenden Polypropylenröhrchen inkubiert. Nach Zentrifu-

gation und 3-maliger Waschung der Zellen in PBS, pH 7,4, schlossen noch über 90 % der Zellen Trypan Blau aus. Die vorbehandelten Zellsuspensionen wurden auf eine Konzentration von 2 x 10^6 Zellen / ml verdünnt und bis zum Gebrauch auf Eis gelagert. 173 µM ^{14}C-Ölsäure, in bestimmten molaren Verhältnissen an BSA gebunden (0,25 : 1 bis 5 : 1 Albumin : Ölsäure), 8,9 µM ^{35}S-BSP (BSP : BSA = 1 : 2), 150 µM ^{3}H-Cholsäure : BSA (1 : 2) und 750 µM ^{14}C-Taurocholsäure : BSA (1 : 1) wurden mit 250 µl Aliquots der vorbehandelten Hepatozytensuspension in einem Volumen von 1 ml PBS, pH 7,4, bei 37°C inkubiert. Nach bestimmten Zeitintervallen wurde die Aufnahmereaktion durch Zufügen von 200 µM Phloretin / 0,1 % BSA in PBS gestoppt. Die Aufnahme der Liganden in die Zellen wurde, wie unter 2.2.8. beschrieben, gemessen.

2.2.10. Lösung der Membranproteine aus der Lipidmatrix der Rattenleberplasmamembranen, Plazentamembranen und microvillösen Membranen des Rattenjejunums

Plasmamembranaliquots zu je 500 mg Protein wurden mit 1 ml 1 % (V/V) Triton X-100 pro mg Protein für 2 Stunden bei 4°C unter leichtem Rühren gelöst. Nach Zentrifugation (60 min, 100.000 g; Beckman Ultrazentrifuge) wurde der klare Überstand über eine Bio-Bead SM 2 Säule (Innendurchmesser 13 mm, Bettvolumen 135 ml, Fließgeschwindigkeit 20 ml/Std) geschickt, um überschüssiges Detergenz zu entfernen. Danach wurden die Membranproteinlösungen auf die Affinitätschromatographiesäulen aufgetragen.

2.2.11. Affinitätschromatographische Untersuchungen

Die Präparation der Affinitätschromatographiegele für Albumin (87), BSP (91), Bilirubin (91) und Ölsäure (86) erfolgte mit nur geringen Abweichungen nach schon veröffentlichten Methoden. Für das Albumin-Agarose Gel wurden 500 mg Rattenalbumin an 10 g vorgequollener und gewaschener CNBr-Sepharose 4B gebunden. Die Kopplungsreaktion wurde während ständiger Rotation für 16 Stunden bei 4°C in 0,1 mM $NaHCO_3$-Puffer (pH 8,3) mit 0,5 M NaCl durchgeführt. Anschließend wurde das Gel für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 1 M Äthanolamin, pH 8, inkubiert, um restliche reaktionsfähige Gruppen zu blocken, und danach mit 1 M NaCl in 0,02 M Na-Azetat (pH 4,0) und 0,02 M Tris-HCl (pH 9,0) im Wechsel gewaschen. 60 ml des Gels (35-45 mg Rattenalbumin/ml) wurden in eine Säule mit 16 mm Innendurchmesser gepackt und für 24 Stunden mit 1 mM $NaHCO_3$-Puffer (pH 7,6) equilibriert. Bromsulphthalein wurde mit der Epichlorhydrinreaktion (88) wie beschrieben (91) an Sepharose 6 B gebunden. Unkonjugiertes Bilirubin wurde mittels eines 6-Kohlenstoffatom-langen Armes an CNBr aktivierte Sepharose 4 B gebunden (48, 91). Die Präparation der Ölsäure-Agarose erfolgte durch Inkubation von 40 ml vorgequollener und gewaschener AH-Sepharose 4 B im 1,5-fachem Volumen einer 0,1 M Natriumoleat-Lösung (pH 10) in Gegenwart von 50 mg 1-Äthyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid pro ml Sepharose für 3 Tage bei 37°C (86).

Jeweils 500 mg der mit Triton X-100 gelösten Membranproteingemische wurden über die Albumin-, BSP-, Bilirubin- und Ölsäure-Agarose Affinitätschromatographiesäule geschickt. Anschließend wurde unspezifisch gebundenes Protein mit PBS bei einer Flußrate von 20 ml/Stunde ausgewaschen bis kein

Protein mehr im Ausfluß der Säule erschien. Die Albumin-, Bilirubin- und Ölsäure-Agarose Säulen wurden mit 8 M Harnstoff, die BSP-Agarose Säule mit 50 µM BSP eluiert und die Eluate durch Ultrafiltration (Diaflow membranes, PM-10, Amicon) konzentriert.

2.2.12. Charakterisierung der affinitätschromatographisch isolierten Proteine

Die Proteinzusammensetzung der Eluate wurde zunächst nach Reduktion mit Dithiothreitol mittels SDS-Elektrophorese auf 11 %-igen Polyacrylamidgelen untersucht (76). Das Protein, welches spezifisch von der BSP-Agarose Säule isoliert werden konnte, wurde auch ohne Reduktion und in Abwesenheit von SDS auf identischen Polyacrylamidgelen (11 %) und Polyacrylamid-Gradientengelen (PAA 3/30, Pharmacia) untersucht. Auch wurde eine analytische isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamidgelen durchgeführt (2117-Multiphor,LKB). Die Gele wurden mit Coomassie Blau (31) zur Identifikation der Position des Proteins gefärbt. Zum Nachweis von Lipid- und Kohlenhydratkomponenten wurde eine Färbung mit Sudan Schwarz und Perjodsäure-Schiff-Reagenz (PAS) durchgeführt (28). Zur weiteren Charakterisierung wurden die Proteine im doppelten radialen Immundiffusionstest mit Kaninchenantikörpern gegen Rattenalbumin, Rattenserumproteine, Rattenleberligandin (Glutathion-S-Transferase B), Rattenleber BSP bindendes Membranprotein (111) und Rattenleber Fettsäure bindendes Membranprotein (112) untersucht.

Gelchromatographische Untersuchungen:

Aliquots der gereinigten Ölsäure bindenden Membranproteine aus Rattenleber und Rattenjejunum wurden mit Spuren von ^{14}C-Ölsäure versetzt und über eine Sephadex G-150 Gelfiltrationssäule geschickt. Diese Säule war vorher mit gereinigten Standardproteinen im Molekulargewichtsbereich von 20.000 bis 158.000 geeicht worden. Über eine identische Säule wurden auch Aliquots des gereinigten BSP-Bindungsproteins mit Spuren von ^{35}S-BSP entweder alleine oder zusammen mit 3,3 % SDS geschickt. Die Proben wurden in einem Gesamtvolumen von 0,3 ml auf eine 1 x 32 cm große Säule (Amicon) aufgetragen und mit 0,1 M NaCl / 1 mM $NaHCO_3$ (pH 7,6) bei einer Fließgeschwindigkeit von 5,5 ml/Std. eluiert. Der Ausfluß der Säulen wurde in 0,43 ml-Portionen gesammelt. Weitere Aliquots der Ölsäure bindenden Proteine wurden mit Spuren von ^{35}S-BSP, ^{14}C-Bilirubin, ^{14}C-Taurocholsäure, durch Ultraschall fein suspendierte ^{14}C-Ölsäure, ^{14}C-Arachidonsäure, ^{14}C-Palmitinsäure, ^{14}C-Linolensäure, ^{14}C-Ölsäure-Cholesterinester und ^{14}C-α-1 Palmitoyl,2-Oleyl Phosphatidylcholin equilibriert und über eine Sephadex G-100 Gelfiltrationssäule geschickt, nachdem diese vorher mit 0,1 M NaCl / 1 mM $NaHCO_3$, pH 7,6, für 24 Stunden gewaschen worden war. Die Elution der Säule erfolgte in demselben Puffer mit einer Fließgeschwindigkeit von 6,7 ml/Std. Der Ausfluß der Säule wurde in 1 ml-Fraktionen gesammelt.
Das BSP bindende Membranprotein (150 µg) wurde mit ^{14}C-Bilirubin bzw. ^{35}S-BSP inkubiert und danach über eine Sephadex G-75 Säule mit 0,1 M NaCl / 1 mM $NaHCO_3$-Puffer, pH 7,6, bei einer Fließgeschwindigkeit von 15 ml/Std. eluiert. Der Proteingehalt aller Fraktionen wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 280 nm und die Radioaktivität

durch Flüssigkeitsszintillations-Spektrometrie (0,2 ml in 10 ml Aquasol), wie unter 2.2.2.3. beschrieben, bestimmt.

2.2.13. Präparation von Antikörpern gegen das BSP / Bilirubin- und Fettsäure bindende Membranprotein

Je 2 weiße Neuseeland-Kaninchen wurden zunächst mit 40 intradermalen Injektionen zu je 25 µg des gereinigten Fettsäure bzw. BSP / Bilirubin bindenden Membranproteins zusammen mit komplettem Freund'schen Adjuvant immunisiert. Die erste Boosterinjektion (i.m.) erfolgte nach 2 bis 3 Monaten mit 500 µg des Antigens in komplettem Freund'schen Adjuvant. 7 Tage danach wurde das Serum der Kaninchen zum ersten Mal untersucht. Im folgenden wurde 7 Tage von jeder Serumentnahme eine erneute Boosterinjektion (i.m.), wie oben beschrieben, gegeben. Der Nachweis und die Reinheit des Antikörpers wurde durch doppelte radiale Immundiffusion auf Agarplatten gegen folgende Antigene untersucht: BSP / Bilirubin bindendes Membranprotein der Rattenleber (111), Fettsäure bindendes Membranprotein aus Rattenleber (112) und Rattenjejunum (113), konzentrierte zytosolische Proteine, Rattenserum, Rattenalbumin, mit Triton X-100 gelöste Plasmamembranproteingemische. Die IgG-Fraktionen der Antiseren wurden nach gebräuchlichen Methoden (59) isoliert.

2.2.14. Immunhistochemische Untersuchungen

Die indirekte Immunfluoreszenztechnik wurde zur Untersuchung

der Verteilung des Fettsäure bindenden Membranproteins in Rattengeweben verwendet. Gefrierschnitte verschiedener Organe der Ratte mit einer durchschnittlichen Dicke von 5 µm wurden luftgetrocknet und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur mit dem Kaninchenantikörper gegen das Fettsäure bindende Membranprotein in einer Verdünnung von 1 : 50, 1 : 100 und 1 : 200 in PBS inkubiert. Die Schnitte wurden 30 min in PBS gewaschen und dann mit FITC, gebunden an Schweine Anti-Kaninchen Serum, in einer Verdünnung von 1 : 20 oder 1 : 50 inkubiert. Nach erneuter gründlicher Waschung mit PBS für 60 - 90 min wurden die Schnitte mit gepuffertem Glycerin auf Objektträger fixiert. Die Spezifität der immunhistochemischen Reaktion wurde durch Anwendung von Kontrollen überprüft:

- Absorption des primären Antikörpers mit gereinigtem Ölsäure bindendem Membranprotein;
- Ersatz des primären spezifischen Antikörpers durch PBS und Präimmunserum.

Die Schnitte wurden 2 Stunden nach Fixierung auf dem Objektträger mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) mit der Filterkombination BP 485, FT 510, LP 520 untersucht.

Die zelluläre Verteilung des BSP-Bindungsproteins wurde ebenfalls mit einer Fluoreszenz-Antikörpertechnik (41) analysiert. Dabei wurden Kaninchen-Antiseren gegen das BSP-Bindungsprotein als primäre Antikörper und ein fluoreszinierendes, konjugiertes Schafs-Anti-Kaninchen Gamma-Globulin (41) als zweiter Antikörper verwendet. Als Substrat wurden Aceton fixierte Gefrierschnitte von normaler Rattenleber, Niere und Milz und unfixierte intakte Hepatozyten in Suspension, die entweder mechanisch (49) oder durch die Col-

lagenase-Technik (15) gewonnen wurden, verwendet. Zusätzlich wurden Untersuchungen an Rattenlebern nach vier- bis fünftägiger Gallengangsligatur vorgenommen. Die Spezifität der immunhistochemischen Reaktion wurde durch Anwendung von Kontrollen überprüft:

- Absorption des primären Antikörpers mit
  a) gereinigtem BSP-Membranprotein (1 mg/ml) in einem Antigen : Antikörper-Verhältnis von 2 : 1
  b) Rattenserumalbumin
  c) 2,5 mg % BSP gelöst in PBS
- Ersatz der primären spezifischen Antikörper durch normales Rattenserum oder PBS

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchungen zur Albuminrezeptor-Hypothese

Zur Untersuchung der Frage, ob ein spezifischer Rezeptor für Albumin an der hepatozellulären Aufnahme organischer Anionen beteiligt ist, wurde die Bindung von hochgereinigtem, nativem und entfettetem ^{125}J-markiertem Rattenalbumin an Rattenleberplasmamembranen analysiert und versucht, aus dem gelösten Membranproteingemisch ein eventuell vorhandenes Protein mit hoher Affinität für Albumin zu isolieren.

Charakterisierung der Leberplasmamembranen

Durch die elektronenmikroskopische Untersuchung konnte gezeigt werden, daß die verwendeten Plasmamembranfraktionen ein einheitliches Bild von Membranstrukturen aufwiesen. Nur wenige Komponenten, typisch für den kanalikulären Anteil der Leberplasmamembranen (z.B. "tight junctions") waren nachweisbar. Neben geringen Verunreinigungen mit Strukturen des rauhen endoplasmatischen Retikulums waren keine anderen Zellorganellen vorhanden. Dementsprechend war die Leberplasmamembranfraktion im Vergleich zum Homogenat in der 5'-Nucleotidase (25-fach) und der Glucagon-stimulierbaren Adenylatzyklase (12-fach) angereichert. Kontaminationen mit Mikrosomen oder Mitochondrien waren, wie durch die Markerenzymbestimmungen gezeigt wurde, nicht vorhanden.

Bindung von ^{125}J-markiertem Albumin an Leberplasmamembranen

In über 40 Inkubationsserien mit 0,2 - 10 mg Membranprotein und unterschiedlichen Mengen ^{125}J-markiertem Rattenalbumin fand sich kein Hinweis für spezifische Bindung an die Leberplasmamembranpräparationen. Obwohl die an die Membranen gebundenen absoluten Mengen des ^{125}J-markierten Albumins in den verschiedenen Experimenten etwas variierten, blieb die Bindung innerhalb der einzelnen Versuchsserien, in denen der Einfluß verschiedener Bedingungen getestet wurde (z.B. Temperatur, Calciumkonzentration, Hitzedenaturierung der Membranen, Zufügen von unmarkiertem Albumin usw.), in der Relation immer konstant.

In einem typischen Experiment (Tabelle 1) (Abb. 1), in welchem 5 pmol ^{125}J-markiertes, natives und entfettetes Rattenalbumin mit Leberplasmamembranen (10 mg Protein) inkubiert wurde, fanden sich nur 2,0 - 3,2 % der Radioaktivität im ersten Membransediment. Dabei war der größte Teil dieser Radioaktivität in der das Sediment umgebenden Flüssigkeit enthalten oder bestenfalls nur lose an das Membransediment assoziiert, da sie durch die folgenden Pufferwaschungen fast vollständig entfernt werden konnte (Abb. 1).

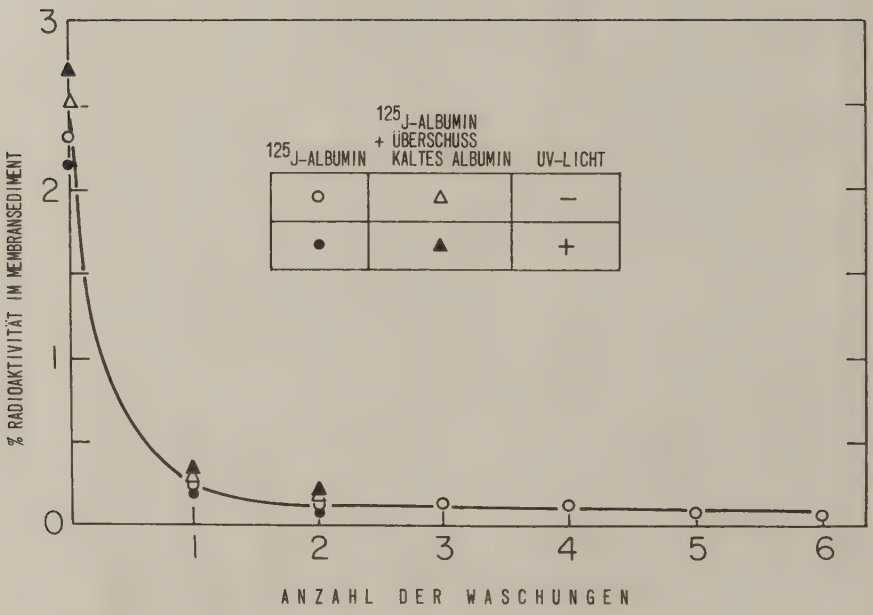
Tabelle 1

Bindung von ^{125}J-markiertem Albumin an Rattenleberplasmamembranen und Erythrozytenmembranen

Alle Inkubationen enthielten 10 mg Membranprotein und 5 pmol natives oder entfettetes ^{125}J-markiertes Albumin. Neben der Inkubation bei Raumbeleuchtung wurde auch eine Photoaffinitätsprobe (UV-Bestrahlung) eingesetzt, die eine kovalente Bindung von Rezeptor-Ligand Paaren bewerkstelligt. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Ausgangsradioaktivität im ersten und mehrmals gewaschenen ( ) Membransediment.

Inkubationsgemisch	Raumbeleuchtung	UV-Bestrahlung
1. Native Leberplasmamembranen Natives ^{125}J-markiertes Albumin	2,3 (0,09)	2,0 (0,10)
+ Überschuß unmarkiertes Albumin	2,5 (0,12)	2,7 (0,15)
Entfettetes ^{125}J-markiertes Albumin	3,1 (0,08)	2,5 (0,11)
+ Überschuß unmarkiertes entfettetes Albumin	3,1 (0,11)	3,1 (0,12)
2. Hitzedenaturierte Leberplasmamembranen Natives ^{125}J-markiertes Albumin	2,6 (0,09)	
3. Erythrozytenmembranen Natives ^{125}J-markiertes Albumin	2,1 (0,13)	

Abbildung 1



Membranbindung von ^{125}J-markiertem Albumin nach mehrmaligem Waschen des Membransedimentes. Über 90 % des ^{125}J-markierten Albumins wurden schon nach einer Waschung entfernt. Nach weiteren Waschungen waren nur noch weniger als 0,1 % der Ausgangsradioaktivität an die Membranen gebunden.

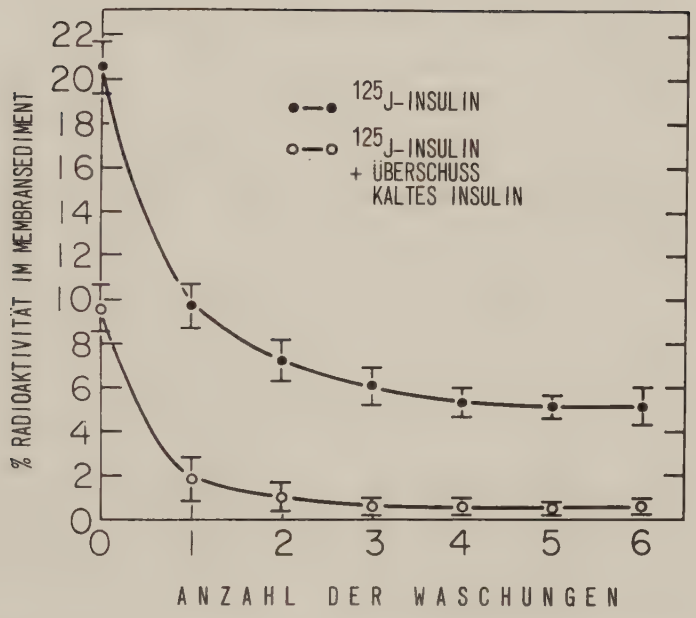
In 15 Doppelinkubationen mit 5 pmol nativem ^{125}J-markiertem Albumin enthielt das initiale Sediment 4,2 ± 1,2 % und das gewaschene Sediment nur 0,9 ± 1,0 % der inkubierten Radioaktivität. In Anwesenheit eines Überschusses von 40 nmol unmarkiertem Albumin waren ebenfalls 4,2 ± 2,5 % bzw. 0,9 ± 1,0 % der Ausgangsradioaktivität im initialen bzw. gewaschenen Membransediment enthalten. Ähnliche Ergebnisse fanden sich in 7 Doppelinkubationsexperimenten mit entfettetem ^{125}J-markiertem Albumin. Wenn ^{125}J-markiertes Albumin allein bzw. in Anwesenheit eines Überschusses nicht markierten Albumins inkubiert wurde, fanden sich im initialen Sediment 4,3 ± 0,7 bzw. 4,3 ± 0,6 % der Ausgangsradioaktivität, und 0,3 ± 0,3 bzw. 0,2 ± 0,07 % waren im gewaschenen Membransediment vorhanden. Die Experimente zeigten, daß die Bindung von nativem und entfettetem ^{125}J-markiertem Albumin an Rattenleberplasmamembranen durch Zufügen eines 8.000-fachen Überschusses unmarkierten Albumins nicht beeinflußt wird.

Um maximale Verfügbarkeit möglicher Rezeptorbindungsstellen zu gewährleisten, wurden die Leberplasmamembranen mit 8 M Harnstoff inkubiert und anschließend mehrmals mit Puffer gewaschen. Damit sollte rezeptorgebundenes Albumin vor der Inkubation mit ^{125}J-markiertem Albumin von den Membranen gelöst werden. Auch diese Vorbehandlung führte zu keiner Änderung der Bindung von ^{125}J-markiertem Albumin (n=3). Um auszuschließen, daß während der Harnstoffvorbehandlung das Bindungsverhalten von Ligand-Rezeptorpaaren durch Denaturierung von Bindungsproteinen beeinträchtigt wird, wurde im Vergleich die Membranbindung von anderen Liganden, wie Bilirubin, Bromsulphthalein und Ölsäure, untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß diese Liganden alle spezifisch an die mit Harnstoff vorbehandelten Membranen banden.

Inkubation bei 37°C (n=2) oder in einem Calcium enthaltenden Medium, welches für die Bindung bestimmter anderer Liganden (z.B. Apolipoprotein E HDL_C)erforderlich ist (51), führte nicht zu einer Zunahme der Albuminbindung. Durch Inkubation mit hitzedenaturierten Membranen wurde die Albuminbindung nicht reduziert (n=4). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß die Bindung an Leberplasmamembranen nicht höher war als an Erythrozytenmembranen (n=3). Diese Beobachtungen (Tabelle 1) ließen vermuten, daß die geringe Bindung von ^{125}J-markiertem Albumin an Rattenleberplasmamembranen unspezifisch ist.

Um sicherzustellen, daß in Leberplasmamembranen bereits beschriebene Rezeptoren auch in den hier verwendeten Membranfraktionen intakt waren, wurden vergleichbare Bindungsuntersuchungen auch mit ^{125}J-markiertem Insulin und LDL durchgeführt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit ^{125}J-markiertem Albumin konnte für ^{125}J-markiertes Insulin gezeigt werden, daß unter den gleichen experimentellen Bedingungen 21 % des Insulins im ersten Membransediment und nach weiteren sechs Waschungen des Sedimentes noch 6 % an die Membranen gebunden waren (Abb. 2).

Abbildung 2



Bindung von ^{125}J-markiertem Insulin an Rattenleberplasmamembranen nach mehrmaligem Waschen des Membransedimentes. Im Mittel waren 20 % am ersten Membransediment und nach weiteren Waschungen noch 6 % fest an die Membran gebunden.

● —— ● ^{125}J-markiertes Insulin

o —— o ^{125}J-markiertes Insulin in Gegenwart eines Überschusses unmarkierten Insulins

Die Spezifität der Insulinbindung wurde deutlich, als nach Zugabe eines 40-fachen Überschusses unmarkierten Insulins die membrangebundene Menge des ^{125}J-markierten Insulins bereits im ersten Sediment über 50 % von 20,5 ± 1,4 auf 9,4 ± 1,0 % der Ausgangsradioaktivität vermindert war und nach mehrmaligem Waschen sogar über 90 % von 5,3 ± 0,7 auf 0,4 ± 0,3 % reduziert war. Ähnliche Ergebnisse fanden sich mit ^{125}J-markiertem LDL, welches in einem Calcium enthaltenden Puffer mit den Membranen inkubiert wurde. Diese Ergebnisse beweisen die Intaktheit von Rezeptoren in der verwendeten Membranfraktion.
Um auszuschließen, daß der fehlende Nachweis einer Albumin-Bindung an Leberplasmamembranen durch eine sehr schnelle Dissoziationsrate des Albumin / Rezeptorkomplexes hervorgerufen wird, wurden die Experimente unter Bestrahlung des Inkubationsgemisches mit UV-Licht (254 nm, 6 min) wiederholt (= Photoaffinitätsprobe). Wie in Tabelle 1 und Abb. 1 gezeigt, war auch unter diesen Bedingungen keine Zunahme der Albuminbindung festzustellen. In der Inkubationsserie unter UV-Bestrahlung fanden sich 3,2 ± 0,6 % der Ausgangsradioaktivität im ersten Membransediment und 0,14 ± 0,01 % nach zwei Waschungen mit Bicarbonatpuffer.

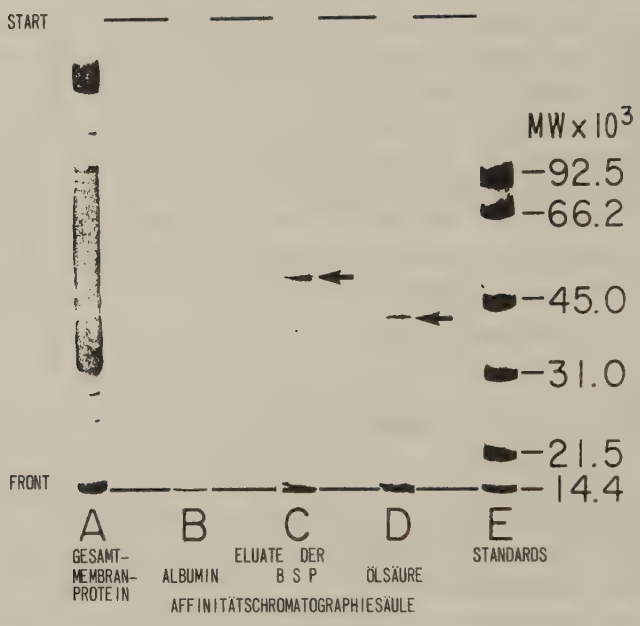
Die Effektivität der verwendeten Photoaffinitätsprobe zur Bindung von Albumin an Makromoleküle mit einer spezifischen Albuminbindungsstelle wurde in dem System: Humanalbumin / Anti-Albumin bewiesen. Anti-Albumin wurde in einem Verhältnis von 4 mg Antikörper pro g Gel-Feuchtgewicht kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose 4 B gebunden. 2 ml dieses Gels wurden mit ^{125}J-markiertem Albumin (2.500 dmp/mg) inkubiert. Nach Einfüllen in eine Säule wurde unspezifisch absorbiertes ^{125}J-markiertes Albumin mit Phosphatpuffer herausgewaschen; insgesamt wurden 1,64 - 1,75 mg des Albumins an das Gel ge-

bunden. Nach Elution des Gels mit 8 M Harnstoff fanden sich über 1,5 mg (über 90 %) des gebundenen Albumins im Eluat und weniger als 10 % blieben am Gel haften. Im Parallelansatz war das Inkubationsgemisch aus Anti-Albumin-Agarose und ^{125}J-markiertem Albumin einer 6-minütigen UV-Bestrahlung (254 nm) ausgesetzt. Während die initial an das Gel gebundene Menge des Albumins gleichblieb, enthielt das Harnstoffeluat nur ca. 65 % (weniger als 1,1 mg) des Albumins und 35 % blieben fest am Gel gebunden. Diese Ergebnisse zeigen, daß ultraviolettes Licht die kovalente Bindung von Albumin an Makromoleküle mit hoher Affinität für Albumin bewerkstelligt, ebenso wie dies für andere Ligand-Rezeptorpaare (z.B. Insulin / Insulinrezeptor) (21) nachgewiesen wurde.

Affinitätschromatographische Untersuchungen

Durch die Behandlung der Leberplasmamembranen mit Triton X-100 ließen sich 85-90% des gesamten Membranproteins aus der Lipidmatrix lösen. Davon fanden sich 86 % nach weitgehender Entfernung des Detergenz über Bio-Beads SM 2 wieder. Die nachfolgende Affinitätschromatographie dieses Proteingemisches über Albumin-Agarose, Elution des Gels mit 8 M Harnstoff und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese des Eluates ergab keinen Hinweis auf das Vorhandensein eines Membranproteins mit hoher Affinität für Albumin. Aus demselben Proteingemisch konnte nach Passage über Agarose, an welche Bilirubin oder Bromsulphthalein kovalent gebunden war, ein einzelnes Protein mit einem Molekulargewicht von 55.000 Dalton nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) dargestellt werden. Ebenso konnte über Ölsäure-Agarose ein einzelnes 40.000 Dalton-Protein (SDS-PAGE) affinitätschromatographisch isoliert werden (Abb. 3).

Abbildung 3



Affinitätschromatographische Untersuchungen von Rattenleberplasmamembranproteinen. Die Abbildung zeigt das Gesamtmembranproteingemisch (A), das BSP bindende Membranprotein (C) und das Ölsäure bindende Protein (D). Im Gegensatz dazu konnte von der Albumin-Agarose-Säule kein Protein isoliert werden (B). Molekulargewichtsstandards sind in Säule E dargestellt.

Der fehlende Nachweis einer spezifischen Bindung von Albumin an Rattenleberplasmamembranen sowie eines Albumin bindenden Membranproteins unterstützen daher nicht die Hypothese, daß Leberplasmamembranen einen spezifischen Albuminrezeptor enthalten.

3.2. Physikochemische und immunhistologische Untersuchungen eines BSP / Bilirubin-Bindungsproteins aus Rattenleberplasmamembranen

Zur Untersuchung der hepatozellulären Aufnahme von Bilirubin und BSP wurde für diese Klasse organischer Anionen ein spezifisches Membranbindungsprotein isoliert, physikochemisch analysiert und mit anderen bereits beschriebenen Bindungsproteinen verglichen. Mit einem Antikörper gegen dieses Protein sollte seine Bedeutung im Membranbindungsprozeß organischer Anionen geklärt werden und immunhistochemisch seine Verteilung in Rattengeweben untersucht werden.

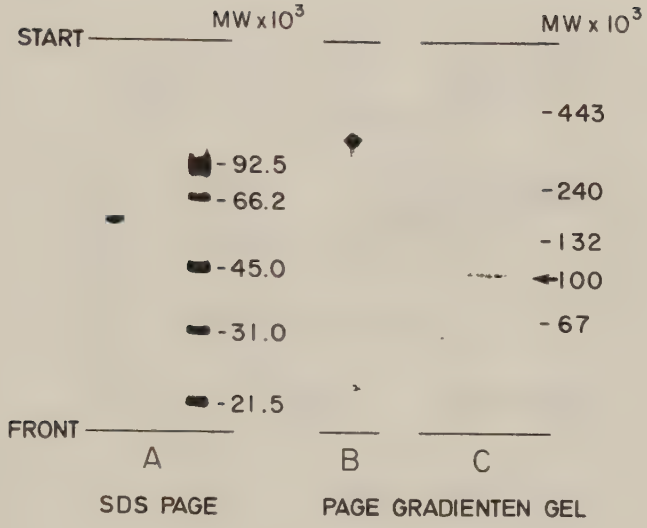
Charakterisierung des BSP und Bilirubin bindenden Proteins aus Rattenleberplasmamembranen

Aus dem Plasmamembranproteingemisch der Rattenleber ließ sich mit der Affinitätschromatographie über Bilirubin-Agarose ein einzelnes Protein eluieren. Es wanderte auf der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) als eine einzelne Bande mit einem geschätzten Molekulargewicht von 55.000 Dalton und co-chromatographierte mit ^{35}S-BSP auf Sephadex G-75. Die Ausbeute dieses Proteins war nur gering und entsprach

etwa 0,3 % des Gesamtproteins, welches auf die Affinitätschromatographiesäule aufgetragen wurde.
Von 500 mg des auf die BSP-Agarosesäule aufgetragenen Membranproteingemisches wurde 0,9 $\pm$ 0,4 (SD) % nach Elution mit 50 µM BSP gewonnen. Dieses Protein wanderte ebenfalls als eine einzelne Bande mit einem geschätzten Molekulargewicht von 55.000 Dalton auf der SDS-PAGE (Abb. 4A) und cochromatographierte mit ^{14}C-Bilirubin ebenso wie mit ^{35}S-BSP auf Sephadex G-75.
In Abwesenheit von SDS und ohne Dithiothreitol-Reduktion erschien das BSP-Bindungsprotein nach Polyacrylamid-Gelelektrophorese ebenfalls als eine einzelne Bande (Abb. 4B). Nach Polyacrylamid-Gradienten-Gelelektrophorese zeigte sich das native Protein mit einem ungefähren Molekulargewicht von 100.000 Dalton (Abb. 4C).

Gel-Filtrationsexperimente des BSP-Bindungsproteins auf einer kalibrierten Sephadex G-150 Säule (Abb. 5, 6) führten zur Elution einer einzelnen Proteinfraktion mit einem Molekulargewicht von 103.000 Dalton. Wurde die Probe zuvor mit SDS behandelt, erschienen zwei Fraktionen mit einem Molekulargewicht von 106.000 und 56.000 Dalton. Beide enthielten ^{35}S-BSP.

Abbildung 4



Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) des BSP-Bindungsproteins aus Rattenleberplasmamembranen:

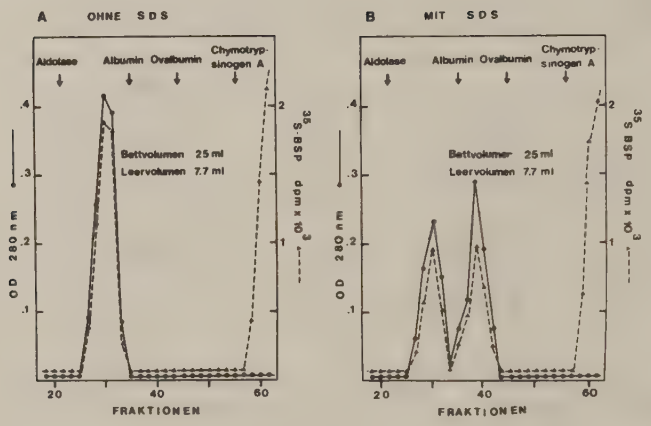
A: SDS-PAGE des isolierten Proteins nach Reduktion mit Dithiothreitol

B: PAGE des unreduzierten Proteins ohne SDS

C: Gradienten-PAGE des unreduzierten Proteins ohne SDS

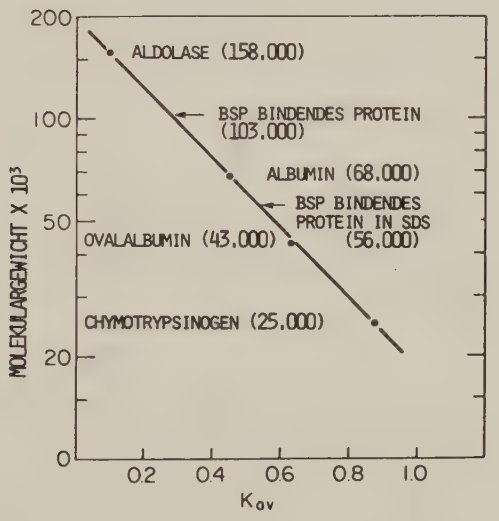
In A und C sind Molekulargewichts-Standards markiert.

Abbildung 5



Co-Chromatographie des BSP-Bindungsproteins mit ^{35}S-BSP auf Sephadex G-150. In Abwesenheit von SDS wird nur eine einzelne Proteinfraktion mit einem geschätzten Molekulargewicht von 103.000 Dalton beobachtet. In Anwesenheit von SDS zeigen sich zwei Proteinfraktionen mit einem Molekulargewicht von 106.000 und 56.000. Beide co-chromatographieren mit ^{35}S-BSP. Experimentelle Einzelheiten sind unter "Methoden" (s. 2.2.) beschrieben.

Abbildung 6



Eichkurve der in den Untersuchungen zu Abbildung 5 verwandten Sephadex G-150 Säule.

Das native, dimere BSP-Bindungsprotein hatte einen isoelektrischen Punkt von pH 3,5 und konnte mit PAS positiv gefärbt werden. Lipidkomponenten waren nach Färbung mit Sudan Schwarz nicht nachweisbar. Kontaminationen mit Albumin oder Ligandin wurden im radialen Immundiffusionstest durch Antikörper gegen Rattenserumalbumin und Ligandin ausgeschlossen.

Charakterisierung des Kaninchen-Antikörpers gegen das BSP-Membranbindungsprotein

Die Immunseren von zwei mehrmals mit BSP-Bindungsprotein immunisierten Kaninchen zeigten eine einzelne Identitätspräzipitationslinie zwischen dem gereinigten Bilirubin und BSP-Membranbindungsprotein und dem Rattenleberplasmamembran-Gesamtproteingemisch. Keine Reaktion zeigte sich mit Rattenligandin, Rattenalbumin, dem Fettsäure bindenden Membranprotein (112) und angereicherter Rattengalle (Abb. 7).

Abbildung 7

Doppelte Immundiffusionsuntersuchung in Agar. Das Antiserum gegen das BSP-Membranbindungsprotein ist im Zentrum der Rosette lokalisiert. Zur Testung der Spezifität wurden folgende Proben untersucht:

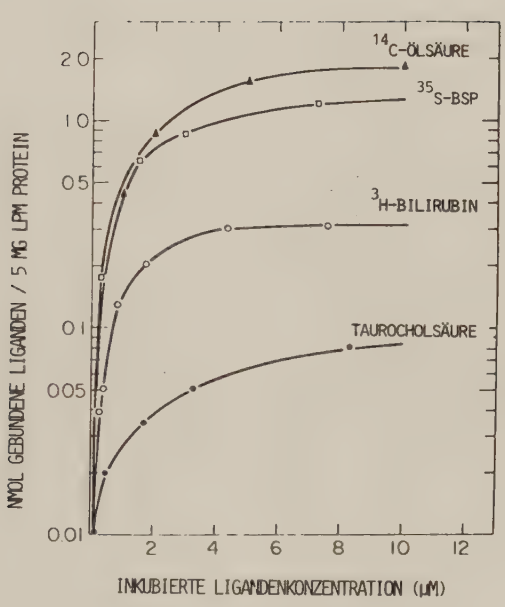
(1) Rattenleberplasmamembran-Gesamtproteingemisch
(2) BSP-Membranbindungsprotein
(3) Bilirubin-Membranbindungsprotein
(4) Ratten-Ligandin
(5) Ratten-Albumin
(6) Ölsäure-Membranbindungsprotein

Das BSP / Bilirubin bindende Protein wurde nach der gleichen Methode, wie ursprünglich von Reichen und Berk (91) beschrieben, isoliert und glich diesem auch bezüglich des Molekulargewichtes nach SDS-PAGE. Um Ähnlichkeit auch mit dem von Wolkoff und Chung dargestellten organische Anionen bindenden Protein (131) nachzuweisen, wurden die in den beiden Laboratorien isolierten Proteine sowie deren Antikörper miteinander ausgetauscht und im Ouchterlony Immundiffusionstest verglichen. Dabei zeigte sich, daß beide Proteine identisch sind (132).

Bindung von organischen Anionen an Rattenleberplasmamembranen

^{14}C-Bilirubin, ^{35}S-BSP, ^{14}C-Taurocholsäure und ^{14}C-Ölsäure banden einer Sättigungskinetik entsprechend an Rattenleberplasmamembranen (Abb. 8). Die für den jeweiligen Liganden (in einem molaren Verhältnis von 1 : 4 an Albumin gebunden) benötigte Substratkonzentration, um maximale Bindung an die Membranen zu erreichen, wurde als Referenzpunkt für die Antikörper-Hemmungsuntersuchungen (siehe unten) herangezogen.

Abbildung 8



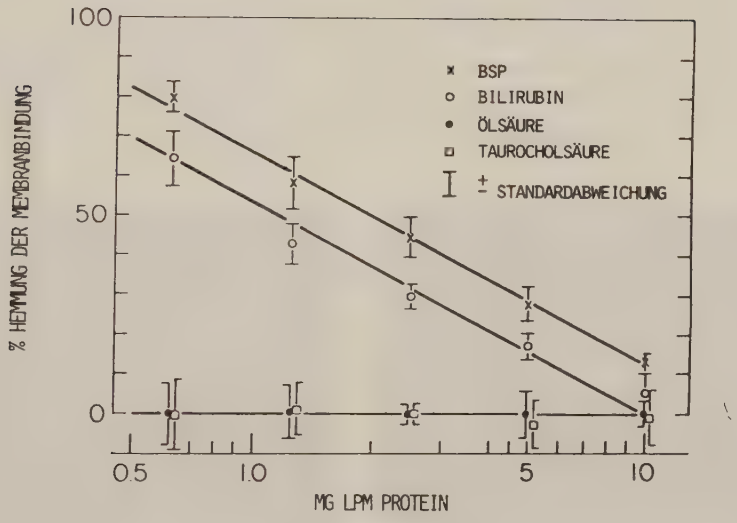
Bindung von ^{14}C-Bilirubin, ^{35}S-BSP, ^{14}C-Taurocholsäure und ^{14}C-Ölsäure an eine repräsentative Rattenleberplasmamembran-Präparation. Jeder Punkt stellt den Mittelwert einer Dreifachbestimmung dar.

Wirkung des Antikörpers auf die Bindung von organischen Anionen an Rattenleberplasmamembranen

Der gereinigte Antikörper gegen das BSP-Membranbindungsprotein verhinderte die Bindung von ^{35}S-BSP und ^{14}C-Bilirubin an Rattenleberplasmamembranen (Abb. 9). In Inkubationen mit einer konstanten Menge des Antikörpers (0,4 mg IgG-Fraktion) fand sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Membranproteinkonzentration und der prozentualen Hemmung der Bindung im Vergleich zu Kontrollinkubationen mit Anti-fibronectin (IgG-Fraktion).

Bei einer Membranproteinkonzentration von 0,6 mg pro Inkubation wurde eine 80 %-ige Hemmung der ^{35}S-BSP-Bindung und eine 65 %-ige Hemmung der ^{14}C-Bilirubinbindung erreicht. Unter identischen Bedingungen wurde die Bindung von ^{14}C-Ölsäure und ^{14}C-Taurocholsäure nicht beeinflußt.

Abbildung 9



Hemmung der Bindung von ^{35}S-BSP und ^{14}C-Bilirubin an Rattenleberplasmamembranen durch das Kaninchenantiserum gegen das Ratten BSP-Bindungsprotein. In Paralleluntersuchungen wurden unterschiedliche Mengen von LPM (0,625 - 10 mg Protein) in 1 ml PBS für 30 min bei 37°C mit 0,4 mg der IgG-Fraktion des Anti-BSP-Bindungsproteins im Vergleich zu der IgG-Fraktion des Anti-Rattenfibronectins inkubiert. Anschließend wurden 200 µl der jeweils untersuchten Liganden, in einem molaren Verhältnis von 1 : 4 an Albumin gebunden, hinzugefügt und das Gemisch für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

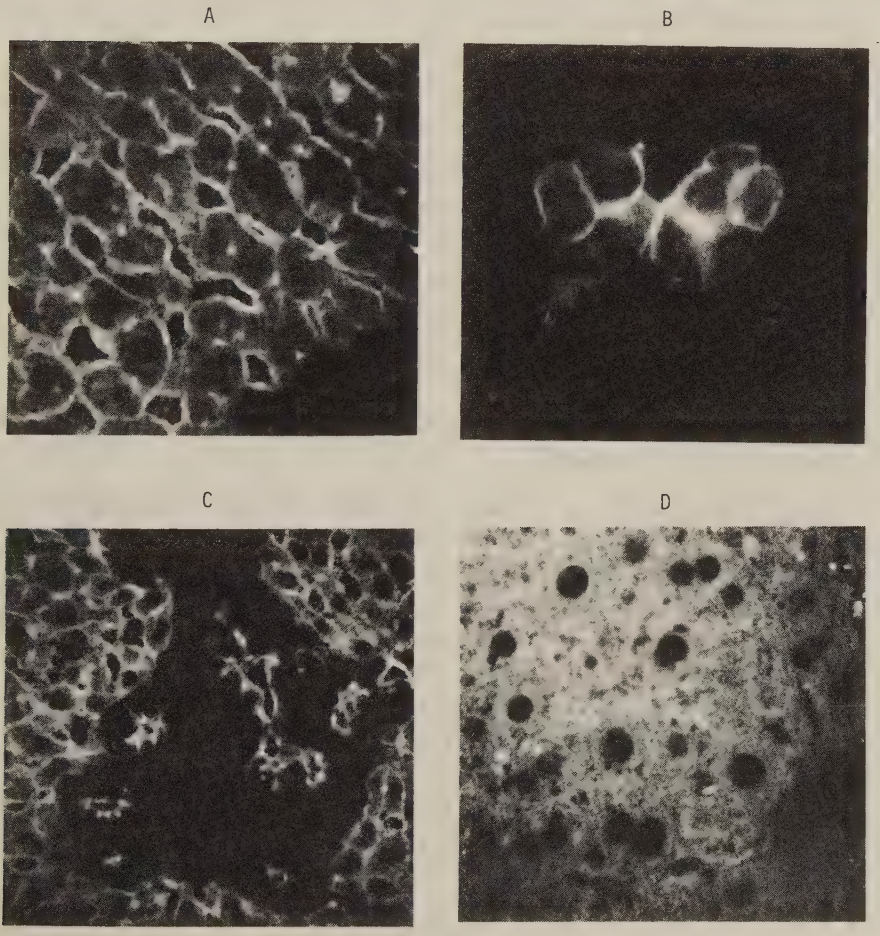
In jedem Fall wurde eine ausreichende Konzentration der Liganden zugefügt, um die LPM unter den gegebenen Bedingungen zu sättigen. Die Bindung der jeweiligen Liganden an LPM wurde in Gegenwart eines jeden der beiden Antikörper bestimmt und die Ergebnisse als prozentuale Hemmung durch das Anti-BSP-Bindungsprotein ausgedrückt im Vergleich zur Bindung in Gegenwart von Antifibronectin. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD von mindestens fünf Experimenten (Abb. 9).

Immunhistochemische Untersuchungen

Nach Inkubation normaler Rattenleberschnitte mit Anti-BSP-Bindungsprotein färbte sich die Plasmamembran fast aller Hepatozyten in einem kontinuierlich linearen oder fokal unterbrochenen Muster (Abb. 10A). Sowohl in Gewebeschnitten als auch in isolierten Hepatozytenpräparationen (Abb. 10B) schienen alle drei Anteile der hepatozellulären Oberfläche den Antikörper zu binden, allerdings zeigten einige Gewebeproben eine etwas stärkere Reaktion mit den Gallencanaliculi als mit den sinusoidalen und interzellulären (lateralen) Membrananteilen. Zentralvenen, von Kupffer'sche Sternzellen sowie endotheliale und andere sinusoidale Zellen und Portalfelder färbten sich in gesunden Rattenlebern nicht an. Rattenlebern, die nach vier- bis fünftägiger Ligatur des Gallenganges untersucht wurden, zeigten ein ähnliches Färbungsmuster der Hepatozyten. Zusätzlich zeigte jedoch die apikale Seite der proliferierenden Gallengangsepithelzellen eine deutliche Färbung (Abb. 10C). Absorption des primären Antikörpers mit gereinigtem BSP-Bindungsprotein eliminierte die Färbung der Hepatozyten (Abb. 10D), während Absorption mit

Rattenserumalbumin oder BSP, gelöst in PBS, keine Wirkung zeigte. Ebenfalls konnte keine Färbung nachgewiesen werden, wenn der primäre Antikörper mit normalem Kaninchenserum oder PBS ersetzt wurde. Normale Rattenniere und -milz zeigten keine spezifische Fluoreszenz.

Abbildung 10



Lengende zur Abbildung 10

A: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Hepatozyten in normalen Leberschnitten nach Inkubation mit Kaninchenantikörpern gegen das BSP-Bindungsprotein. Sinusoidale, interzelluläre und kanalikuläre Oberflächen der Parenchymzellen zeigen spezifische Färbung, Kupffer-Zellen, Endothelzellen und Zellen der Gallenductuli sind nicht reaktiv.

B: Die immunhistochemische Färbung der Oberflächenmembran von mechanisch isolierten Rattenhepatozyten zeigt die Anwesenheit von BSP-Bindungsprotein.

C: Neben Färbung der Hepatozyten werden nach vier- bis fünftägiger Gallengangsligatur auch die Epithelzellen der Gallenductuli angefärbt.

D: Aufhebung der Färbung nach vorheriger Absorption des Antikörpers mit gereinigtem BSP-Bindungsprotein.

3.3. Isolation eines BSP / Bilirubin bindenden Membranproteins aus menschlicher Plazenta

Zur Frage, ob der zelluläre Transport von Bilirubin und verwandten cholephilen Anionen auch beim Menschen durch ein membrangebundenes Carriersystem vermittelt wird, wurde versucht, aus den Plasmamembranen menschlicher Plazenta ein BSP / Bilirubin bindendes Membranprotein zu isolieren.
Die Reinheit der isolierten Plazentaplasmamembranfraktionen und ihre Kontamination mit anderen Zellorganellen wurde durch Markerenzymbestimmungen analysiert (Tabelle 2).
Die 5'Nucleotidase als Leitenzym für Plasmamembranen war 3,8-fach gegenüber dem Homogenat angereichert; Kontaminationen mit Mitochondrien und Mikrosomen waren nur gering.

Tabelle 2

Aktivität von Markerenzymen (U/mg Protein) in isolierten Plazentaplasmamembranfraktionen im Vergleich zum Ausgangshomogenat, Mikrosomen und Mitochondrien (n=3)

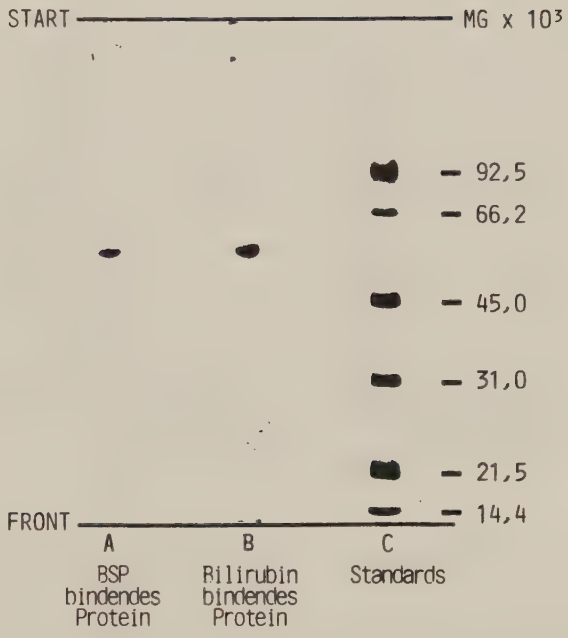
	Plasmamembranen	Homogenat	Mikrosomen	Mitochondrien
5'Nucleotidase	4,3 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,3 ± 0,1
Glucose-6-Phosphatase	1,3 ± 0,1	4,2 ± 0,3	11,1 ± 1,2	2,0 ± 0,8
Succinatdehydrogenase	0,3 ± 0,1	1,3 ± 0,4	0,05 ± 0,02	9,4 ± 1,1

Aus 250 g Plazentagewebe (Feuchtgewicht) konnten 84,9 ± 23,1 mg Plasmamembranprotein gewonnen werden. Nach Solubilisierung von 500 mg Membranprotein mit 500 ml 1 %-igem (V/V) Triton X-100 und Entfernung von überschüssigem Detergenz über eine Bio Bead SM 2 Säule blieben 393 ± 46 mg übrig, die auf die BSP- bzw. Bilirubin-Agarose Affinitätschromatographiesäulen aufgetragen wurden. Davon konnten 0,31 ± 0,24 (SD) % als BSP bindendes Membranprotein und 0,18 ± 0,08 (SD) % als Bilirubin bindendes Membranprotein isoliert werden.

Beide Proteine wanderten als eine einzelne Bande mit einem Molekulargewicht von ungefähr 60.000 Dalton auf der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Abb. 11).

In der isoelektrischen Fokussierung zeigten beide Proteine einen isoelektrischen Punkt von 4,0. Eine positive Färbung mit PAS wies auf Kohlenhydratkomponenten hin. Lipidanteile waren nach Färbung mit Sudan Schwarz nicht nachweisbar. Kontaminationen mit Albumin oder anderen Serumproteinen wurden durch radiale Immundiffusion gegen entsprechende Antikörper ausgeschlossen. Co-chromatographische Untersuchungen des BSP und Bilirubin bindenden Membranproteins mit Spuren von ^{35}S-BSP oder ^{14}C-Bilirubin auf einer Sephadex G-75 Säule zeigten, daß beide Proteine eine hohe Affinität zu beiden Liganden aufwiesen.

Abbildung 11



SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese des BSP (A) und Bilirubin (B) bindenden Membranproteins aus Plazentaplasmamembranen. Molekulargewichtsstandards sind in (C) dargestellt.

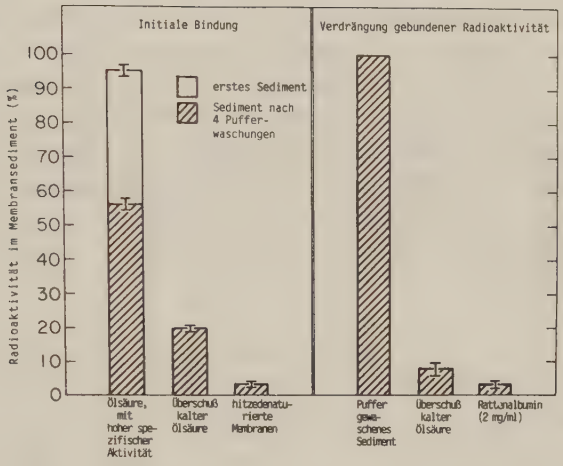
3.4. Untersuchungen zur Bindung von Fettsäuren an isolierte Rattenleberplasmamembranen und Isolation eines Fettsäure bindenden Membranproteins

Da die Bindung an Plasmamembranen den ersten Schritt in einem "Carrier"-vermittelten Aufnahmeprozeß darstellt, war das Ziel dieser Untersuchung die Charakterisierung der Bindung einer repräsentativen Fettsäure, Ölsäure, an sinusoidale Rattenleberplasmamembranen. Weiter sollte versucht werden, ein mögliches Fettsäure bindendes Membranrezeptorprotein zu isolieren und zu charakterisieren. Mit Hilfe eines Kaninchenantikörpers gegen dieses Plasmamembranprotein sollte seine Bedeutung für die spezifische Bindung von Fettsäuren an Rattenleberplasmamembranen untersucht werden und immunfluoreszenzmikroskopisch seine Verteilung in verschiedenen Organen analysiert werden.

Bindung von ^{14}C-Ölsäure an Rattenleberplasmamembranen

Wenn 140 nmol ^{14}C-Ölsäure, entweder alleine oder an Albumin bzw. ß-Lactoglobulin gebunden, mit Leberplasmamembranen (5 mg Protein) inkubiert wurden, fanden sich über 90 % der inkubierten Ölsäuremenge im ersten Membransediment und über 50 % waren noch nach vier Waschungen und Rezentrifugationen am Sediment gebunden (Abb. 12). Die im folgenden angegebenen Bindungsdaten beziehen sich auf die Radioaktivität, die im gewaschenen, rezentrifugierten Sediment verblieb.

Abbildung 12



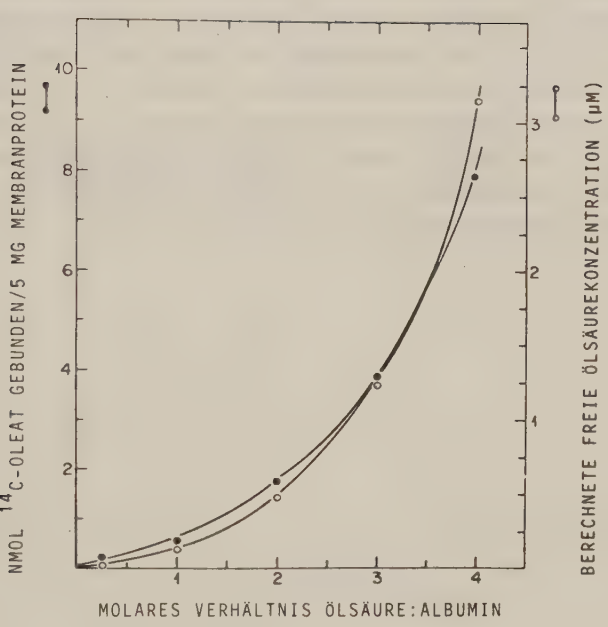
Bindung von ^{14}C-Ölsäure an Rattenleberplasmamembranen. Der linke Teile der Abbildung zeigt die Bindung von ^{14}C-Ölsäure trotz mehrfacher Waschung des Membransedimentes und die Hemmung der Bindung durch einen Überschuß kalter Ölsäure sowie Aufhebung der Bindung nach Hitzedenaturierung der Membranen. Im rechten Teil der Abbildung ist die Verdrängung gebundener ^{14}C-Ölsäure durch Postinkubation mit einem Überschuß nicht radioaktiver Ölsäure sowie mit Rattenalbumin dargestellt.

Die Bindung von ^{14}C-Ölsäure wurde in Anwesenheit eines 10-fachen Überschusses nicht radioaktiver Ölsäure im Inkubationsgemisch um 60 % vermindert und wurde fast vollständig aufgehoben nach Hitzedenaturierung der Membranen. Über 90 % der membrangebundenen Ölsäure konnten durch Postinkubation sowohl mit einem 10-fachen Überschuß nicht radioaktiver Ölsäure als auch mit Rattenalbumin (2 mg)ml) wieder entfernt werden (Abb. 12). Die Bindung von freier Ölsäure an Leberplasmamembranen war sättigungsfähig und hatte ein Temperaturoptimum von 37°C. Bei 22°C betrug die maximale Bindungskapazität, einschließlich der spezifischen und unspezifischen Bindung, 42 nmol/mg Membranprotein.

Einfluß von Albumin und ß-Lactoglobulin auf die ^{14}C-Ölsäurebindung

Die Inkubation von 15,8 bis 252 nmol ^{14}C-Ölsäure mit Leberplasmamembranen in Gegenwart von 63 nmol Albumin (molares Verhältnis = 0,25 : 1 bis 4 : 1) zeigte eine hyperbole Bindungskurve. Ihre Form war deckungsgleich mit der Bindungskurve, die mit ähnlichen Konzentrationen nicht an Albumin gebundener Ölsäure erzielt wurde ebenso wie mit der berechneten freien Ölsäurekonzentration im Inkubationsmedium (Abb. 13).

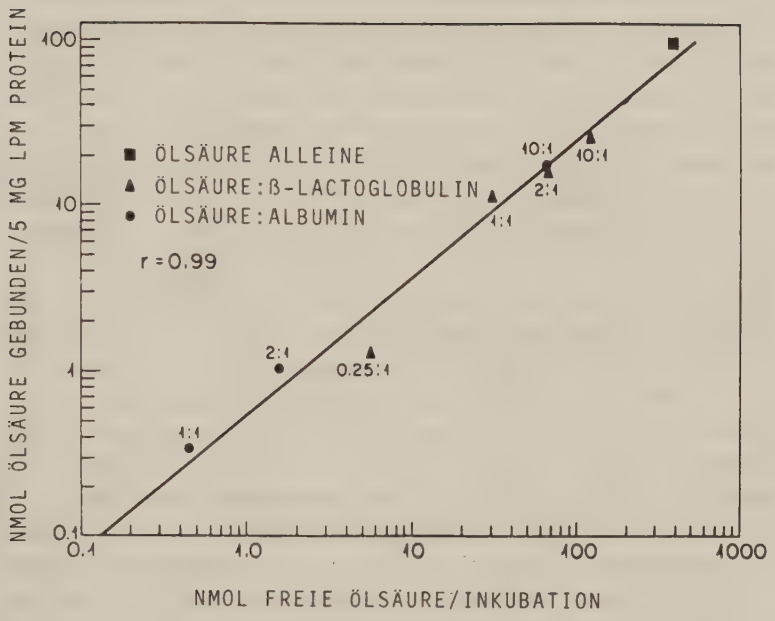
Abbildung 13



Einfluß verschiedener molarer Verhältnisse von Albumin : Ölsäure auf die ^{14}C-Ölsäurebindung an Rattenleberplasmamembranen. Alle Inkubationen enthielten 21,25 µM Rattenalbumin, während die Ölsäurekonzentration zwischen 5,3 und 85 µM variierte. Die Membranbindungskurve von Ölsäure, in verschiedenen molaren Verhältnissen an Albumin gebunden (•), war deckungsgleich mit der berechneten freien Ölsäurekonzentration im Inkubationsmedium (○).

In zusätzlichen Inkubationsserien mit an Albumin bzw. ß-Lactoglobulin gebundener Ölsäure in molaren Verhältnissen zwischen 0,25 : 1 bis 10 : 1 (Ölsäure : Bindungsprotein) konnte nachgewiesen werden, daß die Menge der membrangebundenen ^{14}C-Ölsäure eine Funktion der berechneten Menge der frei in Lösung befindlichen Fettsäuren ist (Abb. 14). Die in Abbildung 14 wiedergegebenen Ergebnisse wurden nach einer Modifikation der Langmuir-Bindungsisotherme (77) analysiert. Es konnte gezeigt werden, daß pro mg Leberplasmamembranprotein 1×10^{15} Bindungsstellen für Ölsäure vorhanden sind mit einer Affinitätskonstanten von $K_{av} = 2,0 \times 10^{8}\ M^{-1}$.

Abbildung 14



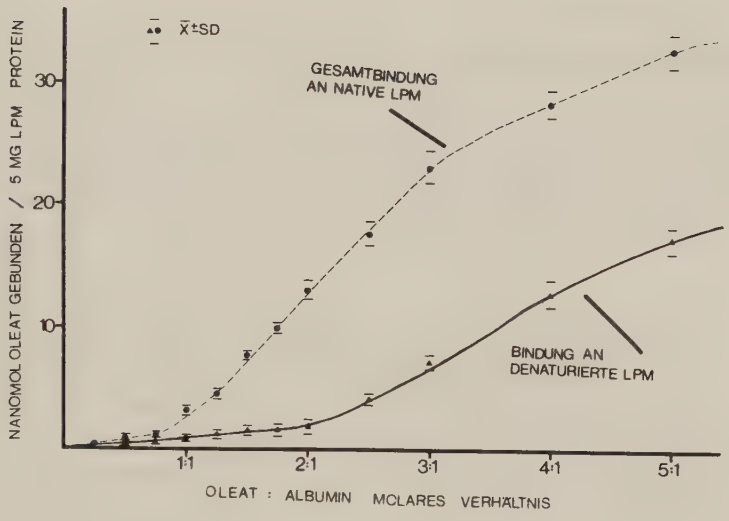
Bindung von ^{14}C-Ölsäure an Rattenleberplasmamembranen als Funktion der ungebundenen Ölsäurekonzentration. ^{14}C-Ölsäure wurde mit Rattenleberplasmamembranen allein (■) , in Form eines Komplexes mit Albumin (•) oder mit ß-Lactoglobulin (▲) inkubiert. Die Ölsäure : Protein Komplexe variierten in einem molaren Verhältnis von 0,25 bis 10,0. Die gebundene Ölsäuremenge korrelierte zur berechneten freien Ölsäurekonzentration im Inkubationsgemisch und war sowohl unabhängig von der Gesamtölsäurekonzentration als auch der Art des Bindungsproteins.

Differenzierung von spezifischer und unspezifischer ^{14}C-Ölsäurebindung an Rattenleberplasmamembranen

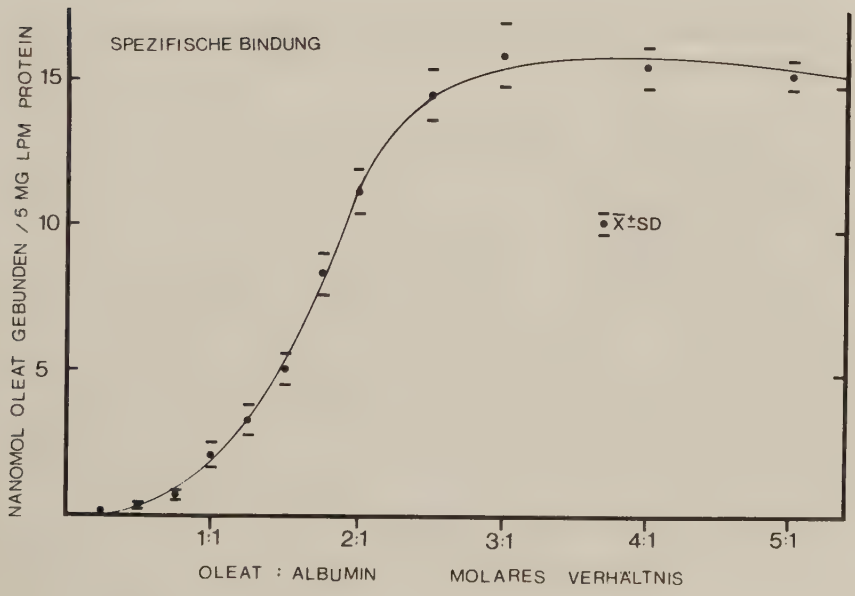
Bei einer konstanten Ölsäurekonzentration von 60 µM im Inkubationsgemisch nimmt mit zunehmendem molaren Verhältnis von Ölsäure : Albumin die berechnete, frei in wässriger Lösung vorhandene Ölsäurekonzentration hyperbolisch von 0,018 bis 6,2 µM zu (105). Diese Konzentrationen sind maximale Schätzwerte, die aus den Gleichgewichtskonstanten für Ölsäure : Albumin Komplexe berechnet wurden (105), ohne Berücksichtigung der unbekannten Bindungskonstanten der inkubierten LPM.
Über diese Konzentrationsbreite nahm die ^{14}C-Ölsäurebindung an native Rattenleberplasmamembranen in nicht linearer Weise zu (Abb. 15A). Nach Abzug der unspezifischen von der Gesamtbindung der ^{14}C-Ölsäure fand sich eine typische Sättigungskinetik (Abb. 15B). In diesem Inkubationssystem betrug die maximale spezifische Ölsäurebindung 16,04 $\pm$ 1,06 nmol / 5 mg Membranprotein bei einem molaren Verhältnis von Ölsäure : BSA von 3 : 1. Trotz weiterer Zunahme des molaren Verhältnisses von Ölsäure : BSA auf 4 : 1 bzw. 5 : 1 und damit verbundenem weiteren 4-fachen Anstieg der berechneten freien Ölsäurekonzentration im Inkubationsgemisch nahm die spezifische Bindung an die Membranen nicht weiter zu.

Abbildung 15

A



B



Legende zur Abbildung 15

A: (oben) Aliquots von nativen und hitzedenaturierten Rattenleberplasmamembranen (LPM) (5 mg Membranprotein) wurden mit 16 µM ^{14}C-Ölsäure, in unterschiedlichen molaren Verhältnissen an BSA gebunden, inkubiert.

B: (unten) Darstellung der spezifischen ^{14}C-Ölsäurebindung an LPM (Gesamtbindung an native LPM minus unspezifische Assoziation an hitzedenaturierte LPM). Mit zunehmender freier Ölsäurekonzentration im Inkubationsmedium zeigte sich eine sättigungsfähige Bindungskinetik. Es sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von drei Wiederholungsexperimenten angegeben.

Bindung verschiedener organischer Anionen an Rattenleberplasmamembranen

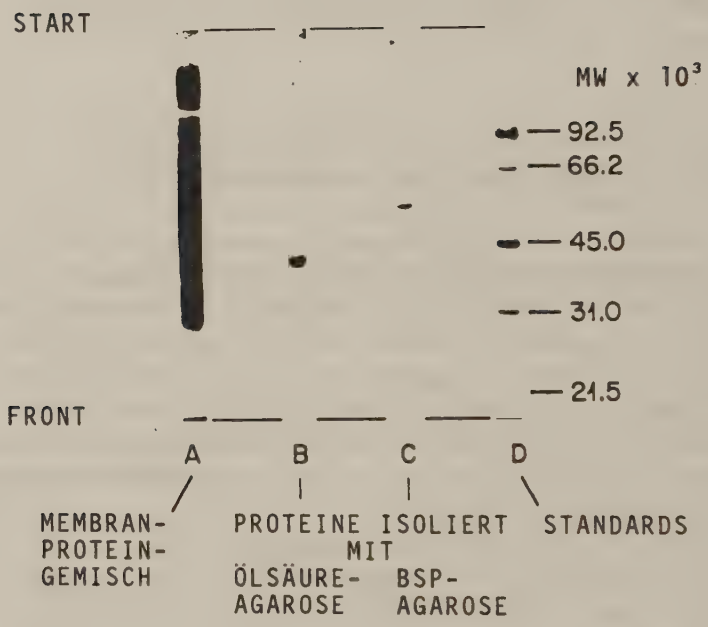
Die Inkubation von Leberplasmamembranen mit ansteigenden Konzentrationen von ^{14}C-Taurocholsäure, ^{35}S-BSP (in einem molaren Verhältnis von 1 : 2 an BSA gebunden) und ^{14}C-Ölsäure (in einem molaren Verhältnis von 3 : 1 an BSA gebunden) zeigte für jeden der drei repräsentativen Liganden sättigungsfähige Bindung - ähnlich wie bei vorangegangenen Untersuchungen (111) (s. auch 3.3.). In Gegenwart eines Überschusses des jeweils unmarkierten organischen Anions betrug die unspezifische Bindung von ^{35}S-BSP weniger als 2 % und von ^{14}C-Taurocholsäure weniger als 6 % der Gesamtbindung und

wurde für die folgenden Antikörper-Ligand Bindungsuntersuchungen (s. unten) nicht weiter berücksichtigt. Die für die jeweilige Substanz benötigte Substratkonzentration, um maximale Bindung an Leberplasmamembranen zu erreichen, wurde als Referenzpunkt für die Antikörper-Ligand Bindungsuntersuchungen herangezogen. Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der Ligand-Plasmamembran-Bindung wurden nicht vorgenommen.

Affinitätschromatographische Untersuchungen

Im Vergleich zu den zahlreichen Proteinbanden des mit Triton X-100 gelösten Membran-Proteingemisches zeigte das konzentrierte und gewaschene Harnstoffeluat der Ölsäure-Agarose Affinitätschromatographiesäule nur eine einzelne Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 40.000 Dalton nach SDS-PAGE (Abb. 16). Von der BSP-Agarose Affinitätschromatographiesäule wurde, wie auch schon vorher berichtet (111) (s. auch 3.3.) ein einzelnes Protein mit einem Molekulargewicht von 55.000 Dalton isoliert.

Abbildung 16



Ergebnis der Affinitätschromatographie des mit Triton X-100 gelösten Rattenleberplasmamembran-(LPM)-Proteingemisches. Die Abbildung zeigt die SDS-Polyacrylamidgelmuster des Gesamt-LPM-Proteingemisches (A) und der einzelnen Banden, die das an Ölsäure-Agarose gebundene Protein(B: Molekulargewicht von 40.000 Dalton) und das an BSP-Agarose gebundene Protein (C: Molekulargewicht von 55.000 Dalton) repräsentieren. Molekulargewichtsstandards sind in Säule (D) dargestellt.

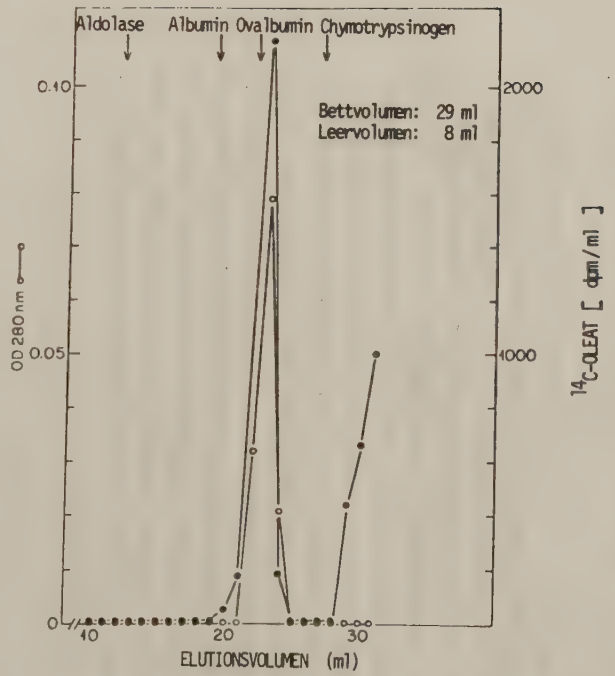
Weitere Charakterisierung des Ölsäure bindenden Membranproteins

SDS-Gele mit dem Ölsäure bindenden Membranprotein waren nicht mit Sudan Schwarz oder PAS anfärbbar. Das Protein stellte sich nach analytischer isoelektrischer Fokussierung als eine umschriebene Bande mit einem isoelektrischen Punkt von 9,0 dar. Im doppelten Immundiffusionstest auf Agarplatten zeigte es keine Reaktion mit Kaninchen-Antikörpern gegen Rattenserumalbumin, Rattenligandin und das BSP-Membranprotein.
Bei der Gelfiltration über Sephadex G-150 co-chromatographierte das Ölsäure bindende Membranprotein zusammen mit ^{14}C-Ölsäure. Das als einzelne Proteinfraktion eluierte Protein zeigte im Vergleich mit anderen Molekulargewichtsstandards auch in diesem nicht reduzierenden, kein Detergenz enthaltenden, Medium ein Molekulargewicht von 40.000 Dalton (Abb. 17).

Die Spezifität des Ölsäure bindenden Proteins wurde in weiteren co-chromatographischen Untersuchungen über Sephadex G-100 mit anderen organischen Anionen sowie verschiedenen hydrophoben Membranbestandteilen analysiert. Dabei konnte Bindung an verschiedene langkettige ^{14}C-Fettsäuren nachgewiesen werden (Abb. 18). Während freie Fettsäuren mit dem Protein co-chromatographierten, wurde der Ölsäureester des Cholesterins und Ölsäure enthaltendes Phosphatidylcholin getrennt von dem Protein eluiert. Ebenso zeigten BSP, Bilirubin und Taurocholsäure keine Affinität zu dem Ölsäure bindenden Membranprotein. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß das isolierte Protein spezifisch für alle langkettigen Fettsäuren ist und sein Aktivitätsspektrum nicht nur auf Ölsäure beschränkt ist.

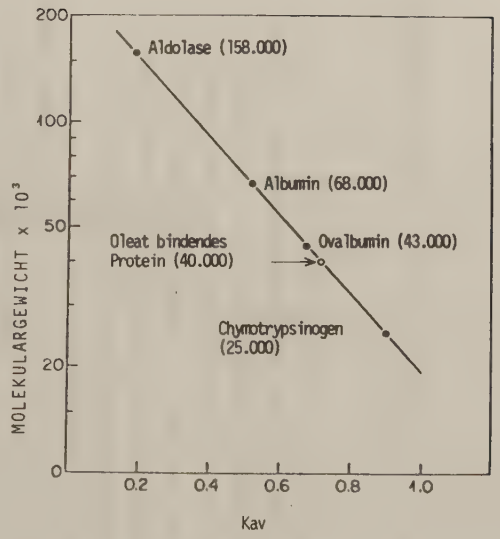
Abbildung 17

A



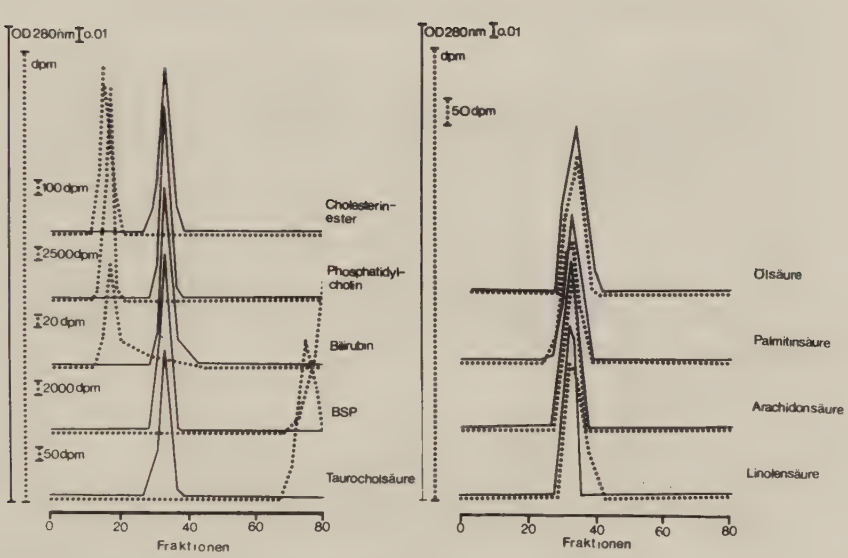
Co-chromatographische Untersuchung von ^{14}C-Ölsäure mit dem Ölsäure bindenden Membranprotein auf Sephadex G-150. Die Flußrate betrug 6,7 ml / Std. Die Säule war vorher mit den gezeigten Molekulargewichtsstandards equilibriert worden.

B



Eichkurve der in Teil A der Abbildung dargestellten Sephadex G-150 Säule. Das Ölsäure bindende Membranprotein wurde entsprechend einem Molekulargewicht von 40.000 Dalton eluiert.

Abbildung 18



An Sephadex G-100 durchgeführte co-chromatographische Untersuchungen mit 0,3 mg Aliquots des Ölsäure bindenden Membranproteins und Spuren von ^{35}S-BSP, ^{14}C-Bilirubin, ^{14}C-Taurocholsäure, ^{14}C-Phosphatidylcholin, ^{14}C-Cholesterinester, ^{14}C-Ölsäure, ^{14}C-Palmitinsäure, ^{14}C-Arachidonsäure und ^{14}C-Linolensäure. Alle freien Fettsäuren wurden zusammen mit dem Protein eluiert. Alle anderen nicht wasserlöslichen Substanzen erschienen im Leervolumen der Säule, während BSP und Taurocholsäure, nicht mit Protein assoziiert, erst nach Fraktion 70 im Ausfluß der Säule eluierten.

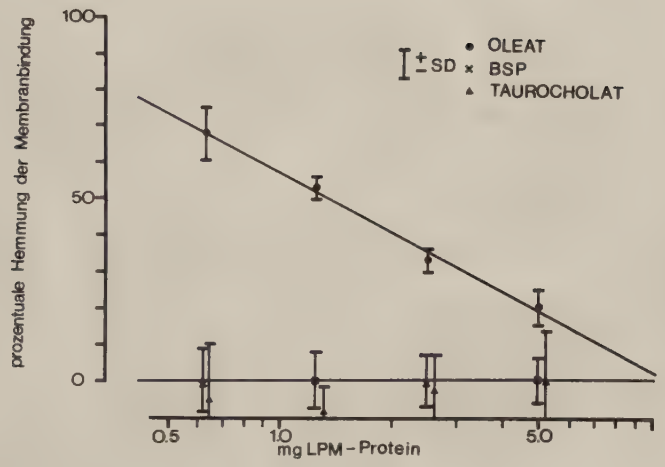
Charakterisierung des Kaninchenantikörpers gegen das Fettsäure bindende Protein aus Rattenleberplasmamembranen

Die Seren beider, wiederholt mit dem Fettsäure bindenden Membranprotein immunisierten Kaninchen zeigten im doppelten Immundiffusionstest gegenüber dem gereinigten Protein und dem gelösten Membranproteingemisch eine einzelne Präzipitationslinie. Keine Reaktion zeigte sich gegenüber dem angereicherten Leberzytosolproteingemisch (einschließlich des Z- oder zytosolischen Fettsäure bindenden Proteins), dem Rattenleber-BSP bindenden Membranprotein, Rattenalbumin und Rattenserum.

Wirkung des Antikörpers auf die Bindung von organischen Anionen an Rattenleberplasmamembranen

Der Antikörper gegen das Fettsäure bindende Membranprotein hemmte die spezifische Bindung von ^{14}C-Ölsäure an Leberplasmamembranen, während die unspezifische Ölsäurebindung an hitzedenaturierte Plasmamembranen und die Bindung von ^{14}C-Taurocholsäure und ^{35}S-BSP unbeeinflußt blieben (Abb. 19). In Inkubationen mit einer konstanten Antikörpermenge (0,2 mg der IgG-Fraktion) fand sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Membran-Proteinkonzentration und der prozentualen Hemmung der spezifischen Ölsäurebindung, verglichen mit Kontrollinkubationen, die Anti-Fibronectin enthielten.

Abbildung 19



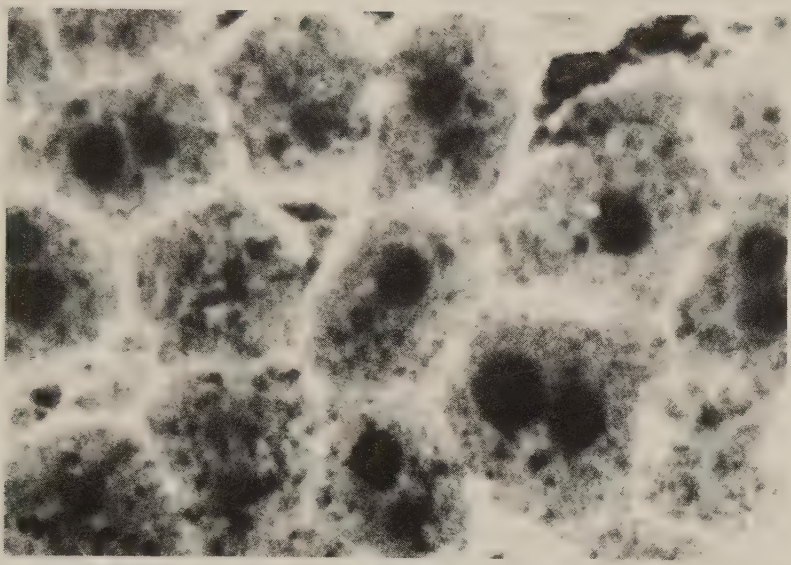
Hemmung der ^{14}C-Ölsäurebindung an Rattenleberplasmamembranen (LPM) durch Kaninchenantikörper gegen das Ölsäure bindende Membranprotein. In Paralleluntersuchungen wurden unterschiedliche Mengen von LPM (0,625 - 5 mg Protein) in 0,4 ml PBS resuspendiert und für 60 min bei 37°C mit 0,2 mg der IgG-Fraktion (0,1 ml) des Anti-Ölsäure bindenden Membranproteins bzw. Anti-Rattenfibronectins inkubiert. Danach wurde die zur Membransättigung notwendige Menge des jeweils untersuchten Liganden hinzugefügt und das Gemisch in einem Volumen von 1 ml für 30 min bei 37°C inkubiert. Die in diesem System zur Sättigung von 1 mg LPM-Protein notwendigen Ligandmengen betrugen: 12 nmol Ölsäure : BSA (3 : 1), 2,4

nmol ^{35}S-BSP : BSA (1 : 2) und 600 nmol ^{14}C-Taurocholsäure. Die Bindung an die Membranen wurde in Gegenwart der Antikörper bestimmt und die Ergebnisse sind ausgedrückt als prozentuale Hemmung durch das Anti-Ölsäure bindende Membranprotein im Vergleich zu Antifibronectin. Es sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen von drei Wiederholungsexperimenten angegeben (Abb. 19).

Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Nach Inkubation normaler Rattenlebergefrierschnitte mit dem Anti-Fettsäure bindenden Membranprotein fand sich eine lineare Fluoreszenz entlang der gesamten hepatozellulären Plasmamembran (Abb. 20), während in den Kontrollschnitten keine Fluoreszenz nachweisbar war.
Mit Ausnahme einer geringen granulären, unspezifischen Autofluoreszenz im Bereich von Lipofuszineinlagerungen, vornehmlich zentrilobulär, war keine zytoplasmatische Färbung vorhanden. Zentralvenen, von Kupffer'sche Sternzellen sowie endotheliale und andere sinusoidale Zellen färbten sich nicht an. In den Portalfeldern zeigte die Oberflächenmembran des Epithels der kleinen Gallengänge ebenfalls eine spezifische Färbung.
Bei der immunhistologischen Untersuchung anderer Organe der Ratte fiel eine deutliche Fluoreszenz an der luminalen Oberfläche der Mukosa des Jejunums auf, während im Ösophagus, Magen und Colon keine Färbung nachweisbar war. Eine ausgeprägte Fluoreszenz fand sich auch im Bereich der Glanzstreifen des Myokards.

Abbildung 20



Immunfluoreszenzfärbung von Hepatozyten in Rattenlebergefrierschnitten nach Inkubation mit Kaninchenantikörpern gegen das Fettsäure bindende Membranprotein. Alle Oberflächenanteile der Hepatozytenmembran zeigen spezifische Färbung. Bis auf geringe unspezifische Autofluoreszenz durch Lipofuszineinlagerungen ist keine zytoplasmatische Färbung vorhanden. Von Kupffer'sche Sternzellen und endotheliale Zellen färbten sich nicht an.

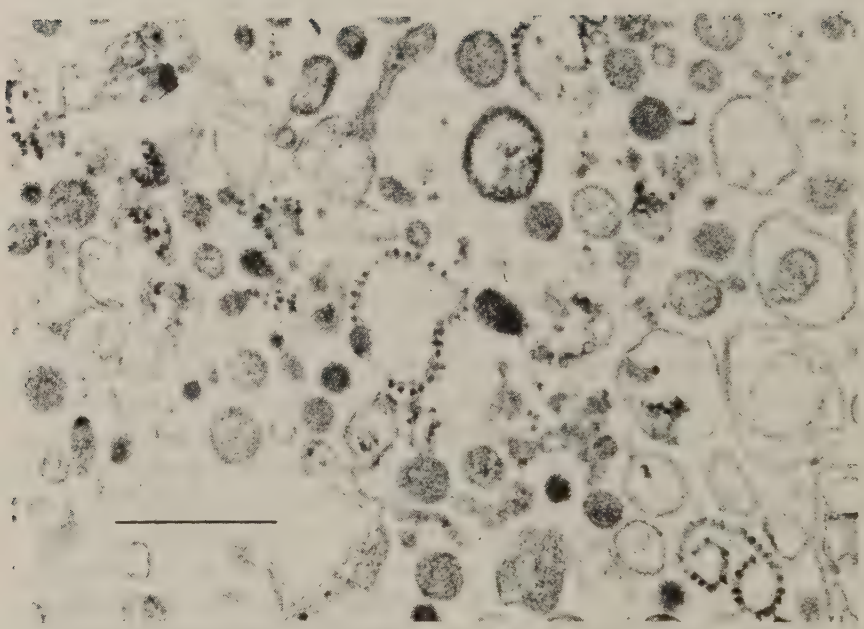
3.5. Untersuchung der Fettsäurebindung an isolierte microvillöse Membranen des Rattenjejunums und Isolation eines Fettsäure bindenden Membranproteins

In den vorangegangenen Untersuchungen wurde gezeigt, daß Fettsäuren spezifisch an Rattenleberplasmamembranen gebunden werden (110) (s. auch 3.4.). Der Nachweis eines Fettsäure bindenden Proteins in diesen Membranen (112) (s. auch 3.4.) und Hinweise für ein sättigungsfähiges Aufnahmeverhalten in embryonale Herzmuskelzellen des Huhnes und Rattenadipozyten (1, 2, 81, 93) führten zur Frage, ob auch die gastrointestinale Resorption von Fettsäuren durch einen spezifischen Rezeptor reguliert wird.
Zur Klärung dieser Frage wurde zunächst das Bindungsverhalten einer repräsentativen Fettsäure, Ölsäure, an isolierte microvillöse Membranen des Rattenjejunums analysiert und versucht, ein mögliches Fettsäure bindendes Protein aus diesen Membranen zu isolieren. Mit Hilfe des Antikörpers gegen das Fettsäure bindende Membranprotein der Rattenleber (112) (s. auch 3.4.) sollte die Identität des jejunalen und hepatischen Proteins überprüft werden. Zusätzlich sollte seine Bedeutung für die Bindung von Fettsäuren an microvillöse Membranen des Jejunums untersucht werden und immunfluoreszenzmikroskopisch seine Verteilung in den verschiedenen Anteilen des Gastrointestinaltraktes analysiert werden.

Charakterisierung der microvillösen Membranen des Jejunums (MVM)

Die elektronenmikroskopische Untersuchung zahlreicher, randomisiert ausgewählter Schnitte verschiedener Präparationen microvillöser Membranen zeigte eine insgesamt homogene Fraktion von meist vesikulären Membranstrukturen (Abb. 21). Einige der Vesikel enthielten elektronendichtes Material, das wahrscheinlich dem Kern der Microvilli entstammt. Kontaminationen mit anderen Zellorganellen waren nicht nachweisbar. Das Bild ähnelte früher veröffentlichten Abbildungen microvillöser Membranen (56, 100).
Die Bestimmung der Saccharase, als spezifisches Leitenzym microvillöser Membranen, zeigte eine spezifische Aktivität von 46,6 $\pm$ 1,6 U/mg Protein in der Membranfraktion im Vergleich zu 6,7 $\pm$ 1,8 U/mg Protein im Ausgangshomogenat. Die Aktivität der 5'Nucleotidase als generellem Marker für Plasmamembranen betrug in der Membranfraktion 43,4 $\pm$ 1,3 U/mg Protein und 4,3 $\pm$ 0,5 U/mg Protein im Homogenat. Kontaminationen mit Microsomen wurden durch die Glucose-6-Phosphatase überprüft (0,163 $\pm$ 0,016 U/mg Protein in der Membranfraktion; 0,440 $\pm$ 0,131 U/mg Protein im Homogenat). Verunreinigungen durch zytoplasmatische und Serum-Proteine wurden durch radiale Immundiffusion der microvillösen Membranfraktionen und Antikörper gegen Rattenligandin, -transferrin, -albumin und -gesamtserumproteine ausgeschlossen.

Abbildung 21



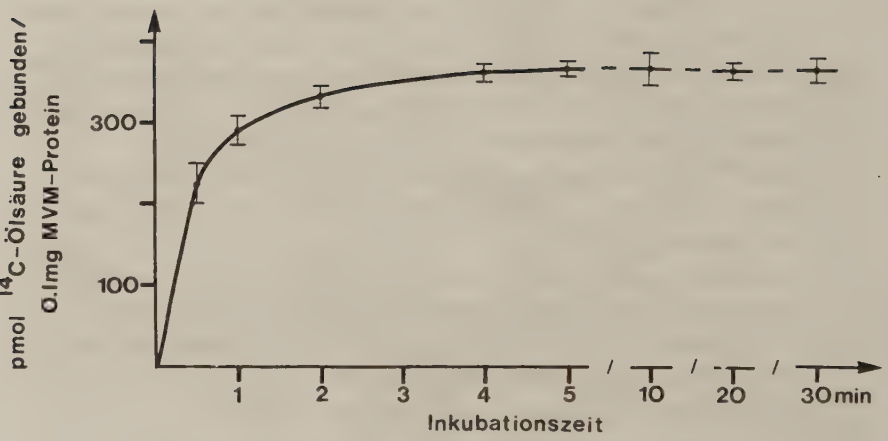
Elektronenmikroskopische Untersuchung der isolierten microvillösen Membranen des Rattenjejunums. Die Abbildung zeigt eine insgesamt homogene Fraktion von meist vesikulären Membranstrukturen. Die Vesikel variieren in Volumen, Form und Menge von eingeschlossenem, elektronendichtem Material. Einige der Membranfragmente sind langgestreckt und umschließen keinen Hohlraum. Die Oberfläche der Membranen ist rauh und zeigte oft ein zahnradähnliches Muster. Kontaminationen mit anderen Zellorganellen sind nicht nachweisbar. Die Markierung entspricht einer Länge von 0,5 µm.

Membranbindungsuntersuchungen

Da Fettsäuren im wässrigen Medium bei Konzentrationen über 10^{-6} bis 10^{-5} M zur Selbstassoziation neigen, wurden die Membranbindungsuntersuchungen mit ^{14}C-Ölsäure, in unterschiedlichen molaren Verhältnissen an Rinderserumalbumin gebunden, durchgeführt. Durch Veränderung des molaren Verhältnisses von Ölsäure : Albumin ließ sich, entsprechend der Gleichgewichtsbindungskonstanten von Ölsäure-Albumin Komplexen (105), die zur Membranbindung zur Verfügung stehende Fettsäurekonzentration im Inkubationsmedium variieren. Zusätzlich wurden Inkubationen mit Konzentrationen unter 4,6 x 10^{-6} M ^{14}C-Ölsäure, frei in wässriger Lösung, durchgeführt.
Die Bindung von ^{14}C-Ölsäure an Aliquots von 0,1 mg MVM-Protein erfolgte schnell (Abb. 22). Nach 3 min war die Gleichgewichtsbindung von 2,272 µM ^{14}C-Ölsäure : Albumin (1 : 1) bereits maximal. Daher wurde in den folgenden Versuchen eine Inkubationszeit von 5 min gewählt.

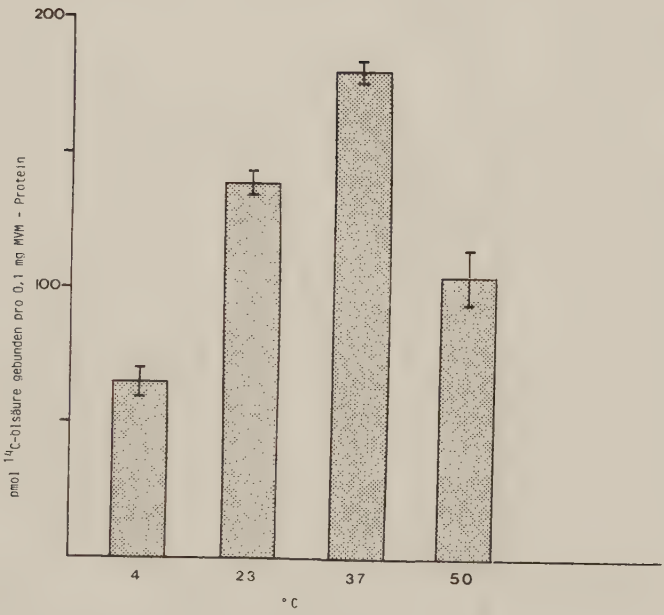
Die Temperaturabhängigkeit der Bindung wurde bei 4°, 23°, 37° und 50°C untersucht. Inkubationsversuche mit 2,272 µM ^{14}C-Ölsäure : Albumin (1 : 10) zeigten maximale Bindung bei 37°C und deutlichen Verlust der Bindungskapazität bei 4° und 50°C (Abb. 23).

Abbildung 22



Zeitverlauf der ^{14}C-Ölsäurebindung an microvillöse Membranen. 2,272 µM ^{14}C-Ölsäure : Albumin (1 : 1) wurden bei 23°C mit Aliquots von 0,1 mg Membranprotein inkubiert. Es sind Mittelwerte $\pm$ SD von 3 Wiederholungsexperimenten angegeben.

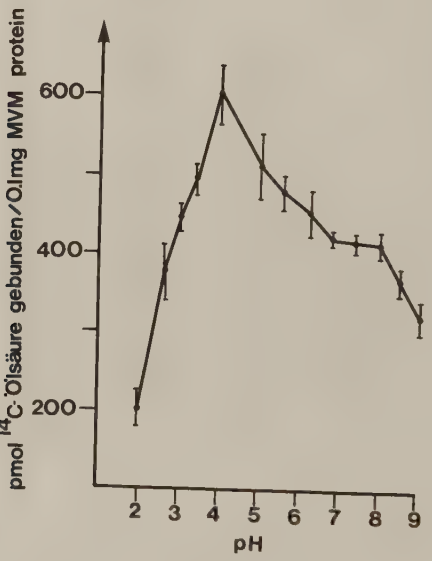
Abbildung 23



Temperaturabhängigkeit der ^{14}C-Ölsäurebindung an microvillöse Membranen. 2,272 µM ^{14}C-Ölsäure : Albumin (1 : 10) wurden bei 4°, 23°, 37° und 50°C mit Aliquots von 0,1 mg Membranprotein inkubiert. Es sind Mittelwerte $\pm$ SD von 3 Wiederholungsexperimenten angegeben.

Der Einfluß unterschiedlicher pH-Werte wurde in Inkbationsexperimenten mit 2,272 µM ^{14}C-Ölsäure frei in wässriger Lösung analysiert, um einhergehende, pH-abhängige Affinitätsänderungen der Ölsäure-Albumin Komplexe auszuschließen. Die Gesamtbindung war bei pH 4 am höchsten (Abb. 24). Im mehr physiologischen pH-Bereich zwischen 6,8 und 8,0 war die Bindung zwar geringer, jedoch relativ konstant.

Abbildung 24

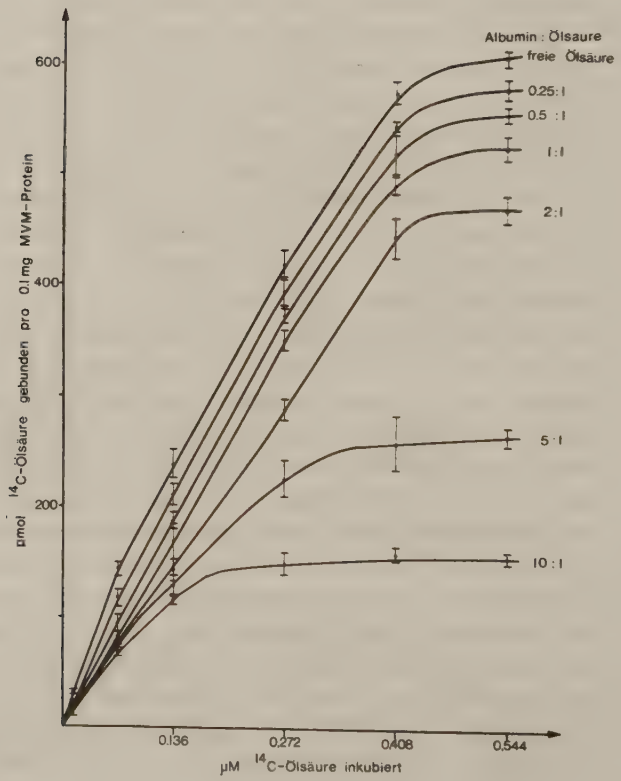


Einfluß des pH-Wertes auf ^{14}C-Ölsäurebindung an microvillöse Membranen. 2,272 µM ^{14}C-Ölsäure, frei in wässriger Lösung, wurden mit Aliquots von 0,1 mg Membranprotein in 440 µl Citrat-Phosphat-Borat / HCl Puffer, pH 2 - 9, inkubiert. Angegeben sind Mittelwerte ± SD von 3 Wiederholungsexperimenten.

Aufgrund der ungewöhnlichen Form dieser pH-Bindungskurve wurde eine weitere Studie angeschlossen. Vorbehandlung der MVM mit Trypsin führte zu keiner signifikanten Änderung der ^{14}C-Ölsäurebindung (583,3 ± 12,7 pmol / o,1 mg MVM-Protein) im Vergleich zu nativen MVM (6o2,1 ± 11,7 pmol / o1, mg MVM-Protein) bei pH 4,o. Bei pH 8,o war die Bindung jedoch von 391,9 ± 14,9 pmol / o,1 mg natives MVM-Protein um 8o,3 % auf 77,2 ± 7,8 pmol / o,1 mg Trypsin-vorbehandeltes MVM-Protein reduziert. Dieses Bindungsverhalten weist auf unterschiedliche Mechanismen der Ölsäure-Membran Interaktion bei diesen pH-Werten hin. Es ist möglich, daß bei niedrigen pH-Werten das weitgehend in nicht ionisierter Form vorliegende Fettsäuremolekül bevorzugt an Membranlipide bindet. Die folgenden Inkubationsexperimente wurden bei einem pH-Wert von 7,6 durchgeführt. Inkubation von o,455 µM ^{14}C-Ölsäure : Albumin (1 : 1) in Gegenwart eines 1.ooofachen Überschusses nicht radioaktiver Ölsäure : Albumin (1 : 1) führte zu einer 98,2 %igen Hemmung der ^{14}C-Ölsäurebindung (von 67,4 ± 3,9 auf 1,24 ± o,14 pmol / o,1 mg MVM-Protein). Ebenso konnte durch Inkubation von o,455 µM ^{14}C-Ölsäure : Albumin (1 : 1o) mit hitzedenaturierten MVM die Bindung um 89 % reduziert werden (von 59,2 ± 6,o auf 6,5 ± 1,o pmol / o,1 mg MVM-Protein). Inkubation von o,1 mg MVM-Proteinaliquots mit ansteigenden Konzentrationen von ^{14}C-Ölsäure, alleine oder in verschiedenen molaren Verhältnissen an Albumin gebunden, führte zu einer Schar von Gleichgewichtsbindungskurven (Abb. 25). Bei einer Konzentration von 4,544 µM zeigten alle Bindungskurven Substratsättigung. Mit abfallendem molaren Verhältnis von Albumin : Ölsäure und damit verbundenem hyperbolen Anstieg der freien Fettsäurekonzentration (105) näherten

sich die Bindungskurven schrittweise derjenigen von Fettsäuren, frei in wässriger Lösung. Die maximale Bindungskapazität betrug 605,8 ± 6,8 pmol / 0,1 mg MVM-Protein.

Abbildung 25

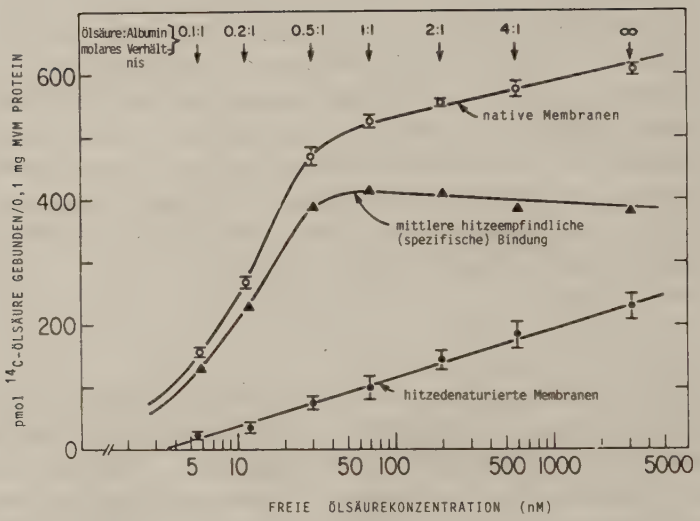


Legende zur Abbildung 25

Bindung von ^{14}C-Ölsäure, frei in wässriger Lösung oder in verschiedenen molaren Verhältnissen an Albumin gebunden, an Aliquots von 0,1 mg MVM-Protein. Mit ansteigender ^{14}C-Ölsäurekonzentration im Inkubationsmedium erreichte die Membranbindung eines jeden Gleichgewichtssystems einen Plateauspiegel. Mit abfallendem molaren Verhältnis von Albumin : Ölsäure nähern sich die Bindungskurven derjenigen von Fettsäuren, frei in wässriger Lösung. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD von 3 Wiederholungsexperimenten.

Zur weiteren Analyse der Fettsäurebindung wurde in Abb. 26 die bei einer ^{14}C-Ölsäurekonzentration von 4,544 µM gefundene, jeweils maximale Membranbindung (s. Abb. 25) gegen die berechnete (105, 133) freie Ölsäurekonzentration im Inkubationsmedium aufgetragen. Die Bindung an native MVM wurde mit der Assoziation von ^{14}C-Ölsäure an hitzedenaturierte MVM verglichen. Während die Bindung an native MVM einen exponentiellen Verlauf zeigte, nahm die unspezifische Bindung an denaturierte Membranen linear zu (Abb. 26). Nach Abzug der unspezifischen von der Gesamtbindung fand sich mit zunehmender freier Ölsäure im Inkubationsgemisch (105) ein sättigungsfähiges Bindungsverhalten (mittlere Kurve). Die Scratchard Analyse (94) der spezifischen ^{14}C-Ölsäurebindung ergab eine maximale Bindungskapazität von 4,6 nmol/mg Membranprotein und eine Dissoziationskonstante (K_D) von $1,5 \times 10^{-8}$ M.

Abbildung 26



Aliquots von nativen und hitzedenaturierten microvillösen Membranen (MVM; 0,1 mg Membranprotein) wurden mit 4,544 µM ^{14}C-Ölsäure, alleine oder in unterschiedlichen molaren Verhältnissen an Albumin gebunden, inkubiert. Die Membranbindung wurde gegen die berechnete freie Ölsäurekonzentration im Inkubationsmedium aufgetragen. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD von 3 Wiederholungsexperimenten. Die mittlere Kurve repräsentiert die spezifische ^{14}C-Ölsäurebindung an MVM (Gesamtbindung an native MVM minus unspezifische Assoziation an hitzedenaturierte MVM).

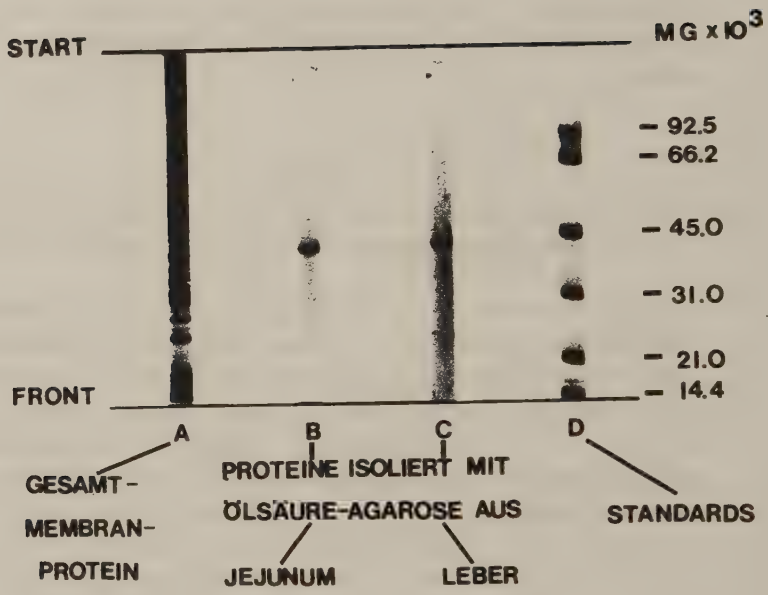
Die Inkubation von 0,5 - 9,1 µM ^{35}S-BSP und 0,5 - 230 µM ^{14}C-Taurocholsäure unter denselben experimentellen Bedingungen wie für ^{14}C-Ölsäure zeigte keinen Hinweis für spezifische Bindung an die microvillösen Membranen des Jejunums.

Isolation und Charakterisierung eines Fettsäure bindenden Proteins aus microvillösen Membranen des Rattenjejunums.

Im Harnstoffeluat der Ölsäure-Agarose Affinitätschromatographiesäule waren 1,25 ± 0,3 mg (SD) Protein der ursprünglich eingesetzten 500 mg des Gesamtmembranproteingemisches enthalten. Im Vergleich mit der Vielfalt der Proteinbanden des solubilisierten Membranproteingemisches zeigte die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) im konzentrierten Harnstoffeluat der Ölsäure-Agarose Säule nur eine einzelne Bande mit einem Molekulargewicht von 40.000 Dalton (Abb. 27). Die Gele mit dem Ölsäure bindenden Membranprotein ließen sich nicht mit PAS oder Sudan Schwarz anfärben.

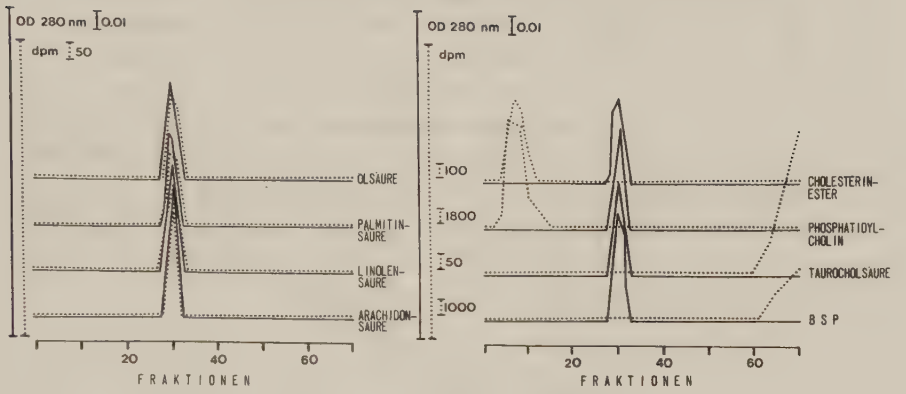
Co-chromatographische Untersuchungen des Ölsäure bindenden MVM-Proteins mit verschiedenen organischen Anionen und anderen hydrophoben Membranbestandteilen über Sephadex G-100 zeigten, daß das Protein zusammen mit allen hier getesteten freien Fettsäuren eluiert wurde (Abb. 28). Dagegen fand sich keine Affinität zum Ölsäureester des Cholesterins, Ölsäure enthaltendem Phosphatidylcholin, ^{35}S-BSP oder ^{14}C-Taurocholsäure (Abb. 28). Diese Untersuchungsergebnisse weisen das isolierte Protein als generelles Fettsäure bindendes Membranprotein aus.

Abbildung 27



SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese des mit Ölsäure-Agarose isolierten Fettsäure bindenden Proteins aus microvillösen Membranen des Rattenjejunums (MVM). Die Abbildung zeigt in Säule (A) das Gesamt-MVM-Proteingemisch und Säule (B) das Ölsäure bindende MVM-Protein (Molekulargewicht 40.000 Dalton). In Säule (C) ist zum Vergleich das Ölsäure bindende Protein aus Rattenleberplasmamembranen dargestellt. Molekulargewichtsstandards sind in Säule (D) markiert.

Abbildung 28



Co-chromatographische Untersuchung des Ölsäure bindenden Proteins aus microvillösen Membranen des Rattenjejunums auf Sephadex G-100. Aliquots von 0,1 mg Ölsäure bindendem Membranprotein wurden mit Spuren von ^{14}C-Ölsäure, ^{14}C-Palmitinsäure, ^{14}C-Arachidonsäure, ^{14}C-Linolensäure, ^{14}C-Ölsäure-Cholesterinester, ^{14}C-Phosphatidylcholin, ^{14}C-Taurocholsäure und ^{35}S-BSP versetzt und auf die Gelchromatographiesäule aufgetragen (s. "Methoden"). Nur die langkettigen freien Fettsäuren wurden zusammen mit der Proteinfraktion eluiert. Der Ölsäure-Cholesterinester und Phosphatidylcholin erschienen im Leervolumen (bis Fraktion 19), Taurocholsäure und BSP im Ausfluß der Säule (ab Fraktion 63).

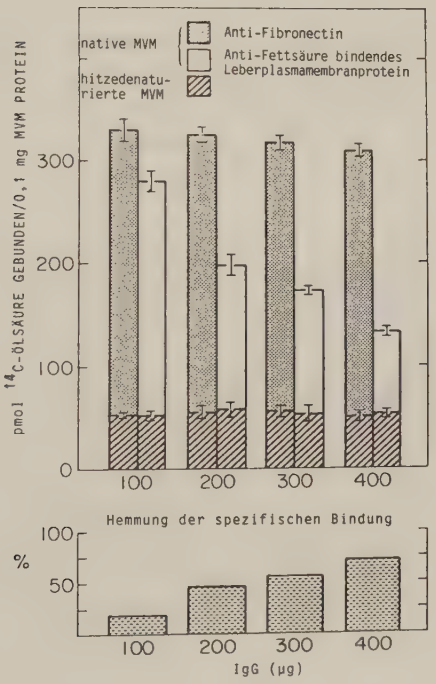
Im doppelten radialen Immundiffusionstest zeigte das Fettsäure bindende Membranprotein keine Reaktion gegenüber Anti-Rattenalbumin, -ligandin und dem Antikörper gegen das BSP / Bilirubin bindende Membranprotein der Leber (111) (s. 3.3.). Dagegen konnte mit dem Antikörper gegen das Fettsäure bindende Membranprotein der Leber (112) (s. 3.3.) eine einzelne Identitätspräzipitationslinie zwischen den Fettsäure bindenden Membranproteinen aus Leber und Jejunum sowie den Gesamtmembranproteingemischen aus beiden Organen nachgewiesen werden. Keine Reaktion fand sich gegenüber Rattenalbumin, Rattenserum, BSP / Bilirubin bindendem Membranprotein der Leber (111) (s. 3.3.) und konzentrierten Zytosolproteinen aus Leber und Jejunum.

Wirkung des Antikörpers gegen das Fettsäure bindende Membranprotein der Leber auf die ^{14}C-Ölsäurebindung an microvillöse Membranen des Rattenjejunums (MVM)

Der Antikörper gegen das Fettsäure bindende Membranprotein der Leber hemmte die ^{14}C-Ölsäurebindung an MVM (Abb. 29). Wenn 2,272 µM ^{14}C-Ölsäure : Albumin (1 : 1) bei 23°C mit ansteigenden IgG-Konzentrationen des Antifibronectins oder des Anti-Fettsäure bindenden Membranproteins inkubiert wurden, blieb die Bindung durch Antifibronectin unbeeinflußt, während sie in Gegenwart ansteigender Konzentrationen des Anti-Fettsäure bindenden Membranproteins exponentiell abnahm. Die Bindung an hitzedenaturierte MVM blieb auch in Gegenwart von 400 µg der IgG-Fraktion des Anti-Fettsäure bindenden Membranproteins unverändert (52,3 $\pm$ 3,4 pmol gegenüber 50,1 $\pm$ 6,3 pmol / 0,1 mg MVM-Protein mit Anti-

fibronectin). Nach Abzug dieser unspezifischen von der Gesamtmembranbindung betrug die exponentiell zunehmende Hemmung der spezifischen Fettsäurebindung in Anwesenheit von 400 µg der IgG-Fraktion des Anti-Fettsäure bindenden Proteins 69,6 %.

Abbildung 29



Legende zur Abbildung 29

Hemmung der ^{14}C-Ölsäurebindung an microvillöse Membranen (MVM) durch Kaninchenantikörper gegen das Fettsäure bindende Membranprotein der Rattenleber. In Paralleluntersuchungen wurden Aliquots von 0,1 mg MVM-Protein mit 2,272 µM ^{14}C-Ölsäure : Albumin (1 : 1) bei 23°C in Gegenwart ansteigender IgG-Konzentrationen des Anti-Rattenfibronectins oder Anti-Fettsäure bindenden Membranproteins inkubiert. Mit zunehmender Konzentration des Anti-Fettsäure bindenden Proteins nahm die ^{14}C-Ölsäurebindung an MVM exponentiell ab, während Antifibronectin keinen Einfluß zeigte. Die Bindung an hitzedenaturierte MVM wurde durch das Anti-Fettsäure bindende Protein nicht beeinflußt. Nach Abzug der unspezifischen Membranbindung betrug die spezifische Hemmung der ^{14}C-Ölsäurebindung in Gegenwart von 400 µg der IgG-Fraktion des Anti-Fettsäure bindenden Proteins 69,6 %. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD von 3 Wiederholungsexperimenten.

Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

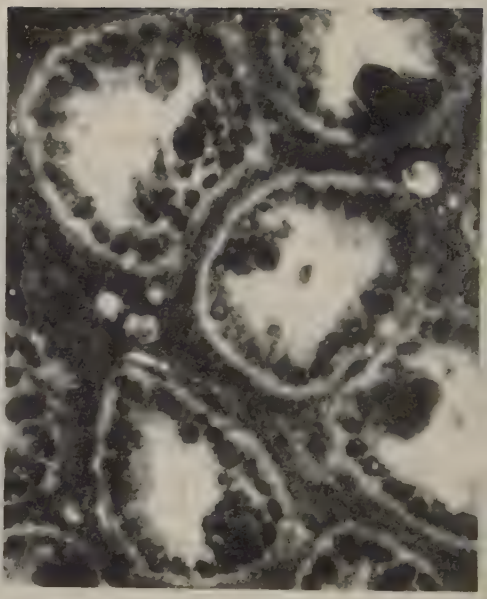
Gefrierschnitte verschiedener Anteile des Gastrointestinaltraktes der Ratte (Ösophagus, Magen, Jejunum und Colon) wurden mit dem Kaninchenantikörper gegen das Fettsäure bindende Membranprotein der Leber behandelt.
In der Mukosa des Jejunums kam es zu einer deutlichen Anfärbung der apikalen Anteile der in den Krypten gelegenen Zellen der Bürstensaummembran, während die angrenzenden Becherzellen ausgespart waren (Abb. 30B). Die Zotten zeigten

eine ausgeprägte lineare Fluoreszenz auf der luminalen Seite der Epithelzellen der Bürstensaummembran, wobei die angrenzenden Becherzellen ausgespart blieben (Abb. 30A). An der lateralen Plasmamembran im Bereich der "tight junctions" fand sich ebenfalls eine betonte Fluoreszenz. In den Kontrollschnitten war keine Fluoreszenz nachweisbar. Ein ähnliches Färbeverhalten zeigte das Ileum. Gefrierschnitte des Ösophagus wiesen keine spezifische Fluoreszenz auf (Abb. 30). Die Färbung der Oberfläche war unspezifisch und wurde durch das Keratin des verhornenden Plattenepithels des Rattenösophagus hervorgerufen. Im Magen schienen sich die Parietalzellen, die einen besonders hohen Energieverbrauch haben, spezifisch anzufärben. Die übrigen Oberflächenepithelzellen zeigten jedoch keine Fluoreszenz. In der Mukosa des Colons ließ sich immunfluoreszenzmikroskopisch ebenfalls kein Fettsäure bindendes Membranprotein nachweisen. In der Submukosa fanden sich jedoch einige Makrophagen, die deutlich anfärbbar waren (Abb. 30D).

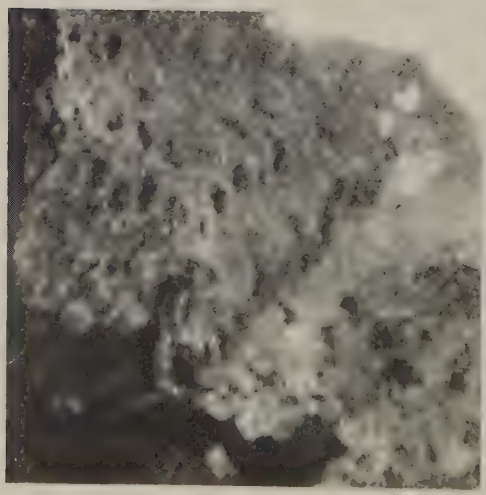
Abbildung 30

A

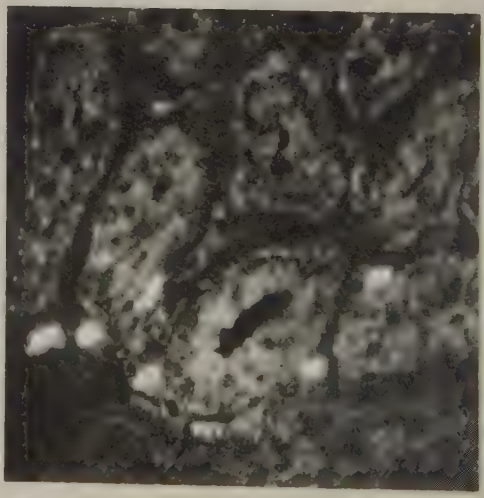
B



C



D



Legende zur Abbildung 30

Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen verschiedener Abschnitte des Gastrointestinaltraktes der Ratte mit Anti-Fettsäure bindendem Membranprotein der Leber. In der Mukosa des Jejunums findet sich eine deutliche Fluoreszenz der Zotten (A) und Krypten (B) im Bereich der apikalen und der lateralen Plasmamembranteile in der Region der "tight junctions". Die Becherzellen färbten sich nicht an. In Kontrollschnitten mit Antigen-absorbiertem Antikörper ist keine Fluoreszenz nachweisbar. In Gefrierschnitten des Ösophagus findet sich keine spezifische Fluoreszenz. Die unspezifische Anfärbung der luminalen Oberfläche ist durch Keratin bedingt (C). Die Colonmukosa ist ebenfalls frei von Fluoreszenz, nur einige Makrophagen der Submukosa färben sich an (D).

3.6. Untersuchungen zur Fettsäureaufnahme in isolierte Hepatozyten

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß die Bindung von ^{14}C-Ölsäure an isolierte Rattenleberplasmamembranen spezifisch, sättigungsfähig und mit hoher Affinität für Membranbindungsstellen erfolgt (110) (s. 3.4.). Aus dem Plasmamembranproteingemisch konnte ein spezifisches Fettsäure bindendes Protein isoliert werden (112) (s. 3.4.). Diese Ergebnisse waren mit der Hypothese eines Carrier-vermittelten zellulären Aufnahmemechanismus für Fettsäuren vereinbar. Zum Nachweis eines solchen Transportprozesses in vivo wurde in dieser Untersuchung die Ki-

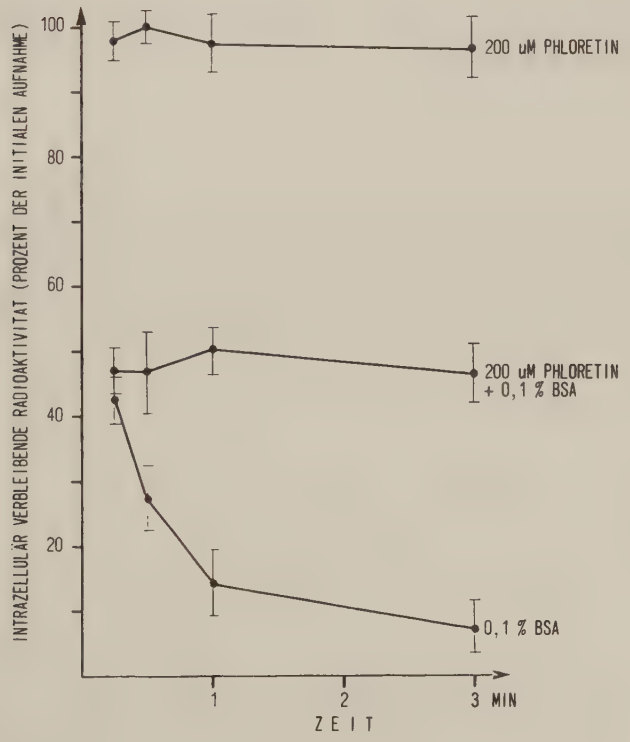
netik des Fettsäureeinstroms in isolierte Hepatozyten untersucht. Dabei wurde die Sättigungsfähigkeit, Spezifität und Reversibilität der Fettsäureaufnahme analysiert. Ferner sollte die Temperatur-, Ionenkonzentrations- und pH-Wert-Abhängigkeit sowie die Wirkung von Phloretin, Ouabain, Stoffwechselinhibitoren und Trypsinvorbehandlung der Zellen auf den Fettsäuretransport untersucht werden.

Initiale Aufnahme von ^{14}C-Ölsäure in isolierte Hepatozyten

Die Kinetik der initialen zellulären Aufnahme von Substanzen als Funktion ihrer extrazellulären Konzentration stellt ein wichtiges Kriterium zur Unterscheidung zwischen Diffusion (eine lineare Beziehung) und Transport (ein sättigungsfähiger Prozeß) dar. Zur zuverlässigen Messung der Aufnahme ist es erforderlich, eine Stopplösung zu verwenden, die nach bestimmten Inkubationszeiträumen den Ein- und Ausfluß der untersuchten Substanzen vollständig blockt und zudem alle membrangebundenen, jedoch nicht transportierten Liganden entfernt. Phloretin ist als wirksamer Inhibitor zellulärer Transportprozesse bekannt (4, 64, 70) und wurde bereits bei der Untersuchung der Fettsäureaufnahme in isolierte Hepatozyten erfolgreich als Stopplösung eingesetzt (1). Auch in den hier durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, daß mit ^{14}C-Ölsäure vorbeladene Hepatozyten 100 % ihrer Radioaktivität behielten, wenn die Inkubation mit 200 µM Phloretin gestoppt wurde (Abb. 31). Durch Zufügen eines Überschusses von Albumin (0,1 % BSA) zu 200 µM Phloretin gelang es, membrangebundene ^{14}C-Ölsäure, die etwa 50 % der an die Hepatozyten assoziierten Radioaktivität

ausmachte, zu entfernen, ohne daß bereits in die Zellen aufgenommene ^{14}C-Ölsäure in das Medium zurückströmte. Über einen Zeitraum von wenigstens drei Minuten nach Zugabe des Phloretins kam es zu keinem signifikanten Verlust von Radioaktivität in das Medium (Abb. 31). Im Gegensatz zum Sistieren des zellulären ^{14}C-Ölsäureausstroms in Gegenwart von Phloretin, führte das Zufügen von 0,1 %-igem Albumin in PBS, pH 7,6, zu einem schnellen und fast vollständigen Ausfluß intrazellulär aufgenommener ^{14}C-Ölsäure (Abb. 31).

Abbildung 31



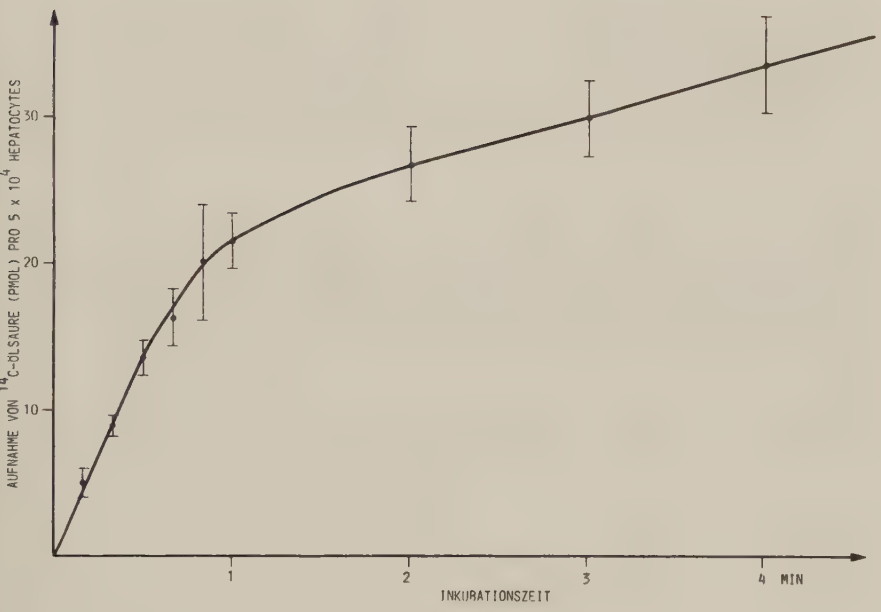
Legende zur Abbildung 31

Einfluß verschiedener Medien auf den Ausstrom zellulär gebundener ^{14}C-Ölsäure. Um die eventuell stattfindende Esterifikation intrazellulär aufgenommener ^{14}C-Ölsäure weitgehend zu reduzieren, wurden Hepatozyten mit Glucose-freiem Medium isoliert. 100 µl der Zellsuspension (2×10^6 Zellen / ml) wurden bei 37°C mit 11,5 µM ^{14}C-Ölsäure : Albumin (1 : 1) für 30 sec in 1 ml PBS, pH 7,6 inkubiert. Unmittelbar danach (0 min) wurde 1 ml der jeweiligen, in der Abbildung gezeigten Lösung in PBS (37°C) hinzugefügt. Nach den angegebenen Zeitintervallen wurden die Proben filtriert und mit 20 ml PBS gewaschen. Die Kontrollen (100 % Radioaktivität) wurden unmittelbar nach der 30 sec-Inkubation filtriert. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD von 3 Wiederholungsexperimenten. Identische Egebnisse wurden mit Hepatozyten erzielt, die mit Glucose-enthaltendem Medium isoliert wurden.

Diese Ergebnisse weisen neben der Wirksamkeit der Phloretin / BSA Stopplösung darauf hin, daß nach einer 30 sec-Aufnahmeperiode der größte Teil der intrazellulären Fettsäuren noch in freier Form vorliegt und durch Zufügen eines Überschusses von Albumin rasch wieder ausgeschleust werden kann.

Die Inkubation von 0,96 µM ^{14}C-Ölsäure, frei in wässriger Lösung, mit 0,5 x 10^6 Hepatozyten zeigte über die ersten 30 sec eine maximale, lineare Aufnahmekomponente. Danach fiel die Aufnahmegeschwindigkeit kontinuierlich ab und blieb dann zwischen 1 und 7 min wieder konstant (Abb. 32).

Abbildung 32



Legende zur Abbildung 32

Zeitverlauf der ^{14}C-Ölsäure. 250 µl der Zellsuspension (2×10^6 Zellen / ml) wurden mit 0,96 µM ^{14}C-Ölsäure, frei in wässriger Lösung, bei 37°C in 1 ml PBS, pH 7,4, inkubiert. Nach den angegebenen Zeitintervallen wurden 100 µl des Inkubationsgemisches in 1 ml 200 µM Phloretin / 0,1 % BSA in PBS (37°C) pipettiert, filtriert und gewaschen, wie unter "Methoden" beschrieben. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD von 3 Wiederholungsexperimenten.

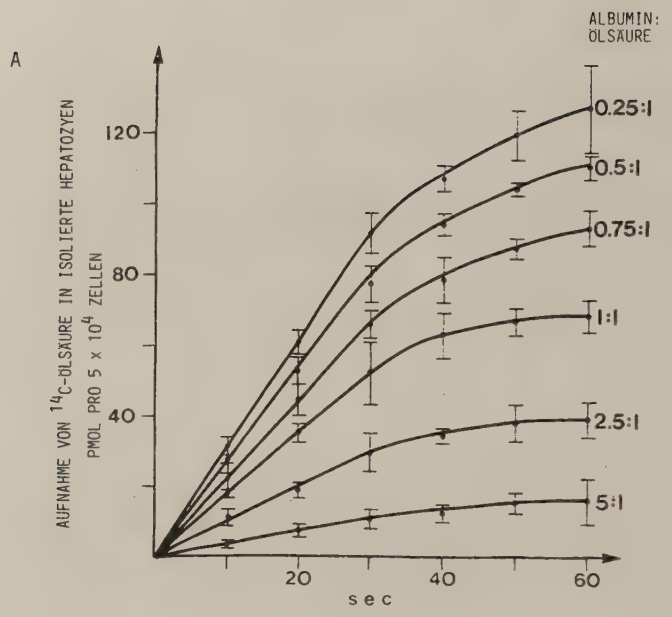
Während die initiale lineare Aufnahmekomponente den Fettsäureeinstrom in die Zelle repräsentiert, stellt die Aufnahme nach 30 sec die "Nettoakkumulation" dar, die aus Einstrom, Ausstrom und intrazellulärem Stoffwechsel resultiert.

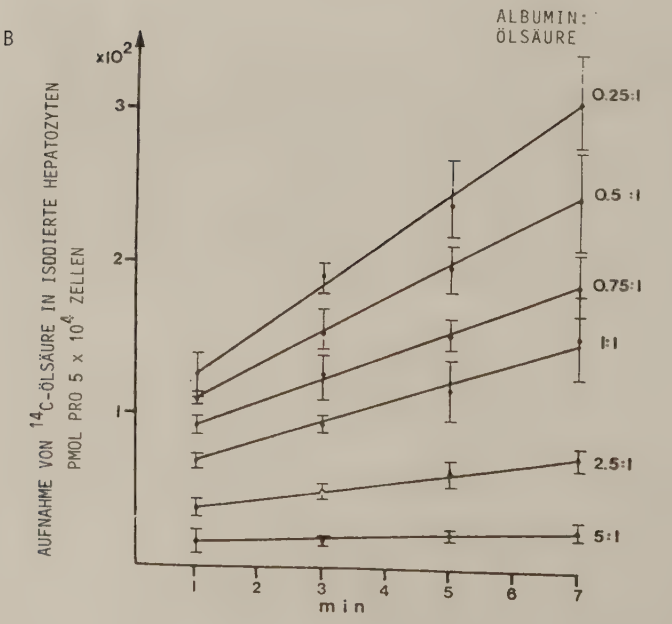
Höhere freie Ölsäurekonzentrationen wurden wegen ihrer schlechten Löslichkeit in wässrigen Lösungen bei physiologischen pH-Werten nicht verwendet (24, 58).

^{14}C-Ölsäureaufnahme als Funktion ihrer extrazellulären Konzentration

Zur Beeinflussung der freien Ligandkonzentration im Inkubationsmedium wurden 173 µM ^{14}C-Ölsäure so an BSA gebunden, daß das molare Verhältnis von Albumin : Ölsäure zwischen 5 : 1 und 0,25 : 1 variierte. Dadurch kann eine hyperbole Zunahme der freien Fettsäurekonzentration im wässrigen Medium erreicht werden (105), ohne die Löslichkeit der freien Fettsäuren zu überschreiten (24, 58). Die Konzentration von 173 µM ^{14}C-Ölsäure wurde gewählt, da in Voruntersuchungen mit kontinuierlich ansteigenden Konzentrationen von ^{14}C-Ölsäure : Albumin (0,25 : 1) bei 173 µM das Maximum der zellulären Aufnahmekapazität nach fünfminütiger Inkubation erreicht war. Die Aufnahmegeschwindigkeit eines jeden Albumin-Ölsäure Komplexes war innerhalb der ersten 30 sec schnell und linear und fiel danach über weitere 30 sec kontinuierlich ab (Abb. 33A). Die Extrapolation der linearen, initialen Aufnahme zum "0-Zeitpunkt" ergab einen Schnittpunkt mit der Y-Achse im 0-Punkt. Dies wies darauf hin, daß unter den angewandten experimentellen Bedingungen überwiegend intrazelluläre Aufnahme und nicht Bindung an die Oberfläche der Hepatozyten gemessen wurde. Die "Netto"-Aufnahmeraten waren zwischen 1 und 7 min für jeden Albumin-Ölsäure Komplex wieder linear, jedoch im Vergleich zur initialen Aufnahme deutlich reduziert (Abb. 33B).

Abbildung 33





Legende zur Abbildung 33

^{14}C-Ölsäureaufnahme als Funktion der extrazellulären Konzentration. 250 µl der Zellsuspension (2 x 10^6 Zellen / ml) wurden mit 173 µm ^{14}C-Ölsäure, in unterschiedlichen molaren Verhältnissen an Albumin gebunden, bei 37°C in 1 ml PBS, pH 7,6, inkubiert. Nach den angegebenen Zeitintervallen wurden 100 µl des Inkubationsgemisches in 1 ml 200 µM Phloretin / 0,1 % BSA (37°C) pipettiert, filtriert und gewaschen, wie unter "Methoden" beschrieben.

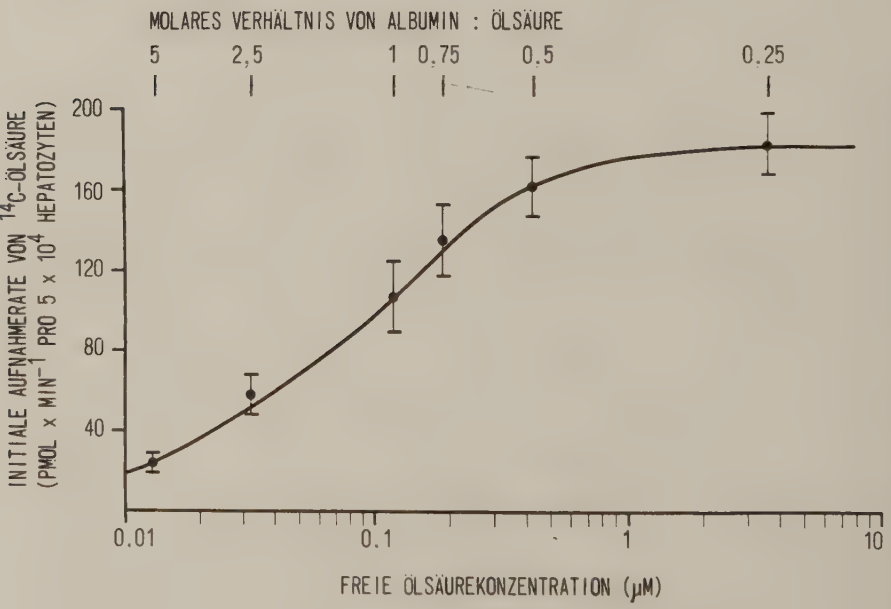
A: Dargestellt ist die zelluläre Aufnahme innerhalb der ersten Inkubationsminute. Für jeden der Albumin-Ölsäure Komplexe ist die Aufnahme in den ersten 30 sec maximal und linear.

B: Dargestellt ist die zelluläre Aufnahme zwischen 1 und 7 min nach Inkubationsbeginn. Für jeden der Albumin-Ölsäure Komplexe nimmt die "Netto"-Aufnahme linear zu, ist jedoch im Vergleich zur initialen Aufnahme (bis 30 sec) deutlich langsamer.

Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD von 3 Wiederholungsexperimenten.

Zur weiteren Analyse der Aufnahmekinetik wurden die initialen zellulären Aufnahmeraten (V_o) gegen die berechneten (105, 133) freien Ölsäurekonzentrationen im jeweiligen Inkubationssystem aufgetragen (Abb. 34). Wie in der Abbildung dargestellt, nimmt der Fettsäureeinstrom mit zunehmender extrazellulärer Ligandkonzentration exponentiell, entsprechend einer Sättigungskinetik, zu. Die Michaelis-Menten Konstante (K_m) betrug 8,868 x 10^{-8} M und die maximale Aufnahmegeschwindigkeit (V_{max}) 135,08 pmol x min^{-1} pro 5 x 10^4 Hepatozyten.

Abbildung 34



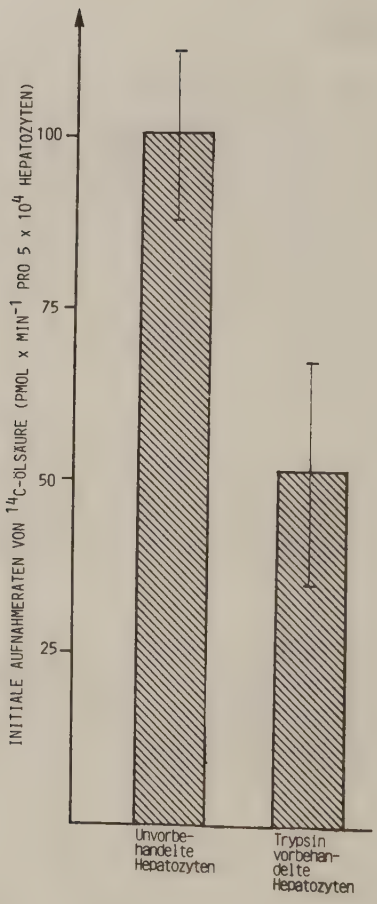
Legende zur Abbildung 34

Initiale Aufnahmeraten von ^{14}C-Ölsäure als Funktion der extrazellulären Ligandkonzentration. Die initiale Aufnahmegeschwindigkeit (V_0) eines jeden Albumin-Ölsäure Komplexes wurde aus den in Abb. 33 dargestellten Ergebnissen berechnet und gegen die berechneten freien Fettsäurekonzentrationen im jeweiligen Inkubationsansatz aufgetragen. Die zellulären Einstromraten zeigen mit zunehmender Substratkonzentration eine Sättigungskinetik ($K_m = 8{,}868 \times 10^{-8}$ M, $V_{max} = 135{,}08$ pmol x min^{-1} pro 5×10^4 Hepatozyten). Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD.

Einfluß von Trypsinvorbehandlung der Hepatozyten auf die ^{14}C-Ölsäureaufnahme

Mit Trypsin vorbehandelte Hepatozyten zeigten eine 48,6 %-ige Verminderung der initialen ^{14}C-Ölsäureaufnahmegeschwindigkeit (V_0) (Abb. 35). Dies weist darauf hin, daß der zelluläre Fettsäureeinstrom durch ein Carrier-Protein vermittelt wird.

Abbildung 35



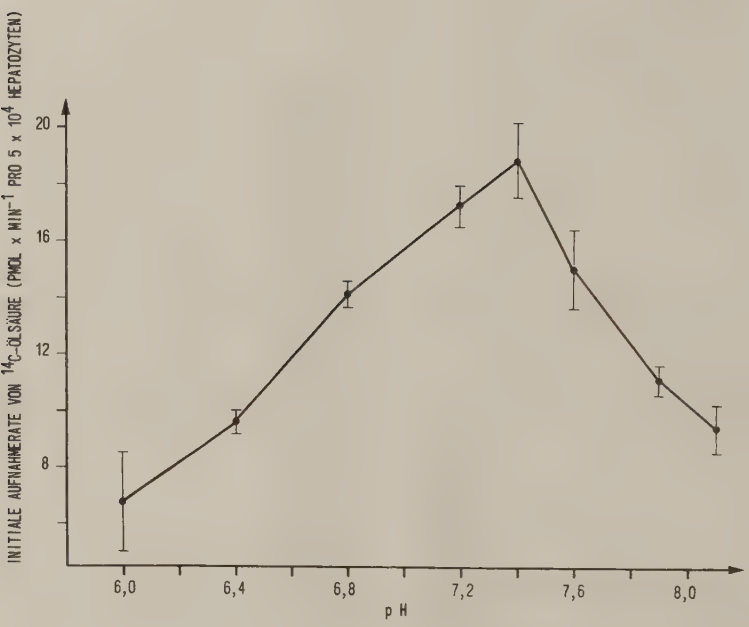
Einfluß von Trypsinvorbehandlung der Hepatozyten auf die ^{14}C-Ölsäureaufnahme. 2 ml der Zellsuspension (2 x 10^6 Zellen / ml) wurden für 15 min mit 0,6 mg Trypsin in 10 mM Tris / HCl, pH 8,0, bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen

dreimal mit PBS, pH 7,4, gewaschen, zentrifugiert und auf 2×10^6 Zellen / ml resuspendiert. Die Kontrollsuspension wurde in 10 mM Tris / HCl, pH 8,0, ohne Trypsin vorinkubiert und danach ebenso wie die Trypsin-behandelten Zellen gewaschen, zentrifugiert und resuspendiert. Die Lebensfähigkeit betrug in beiden vorbehandelten Zellsuspensionen über 90 %. 250 µl der Hepatozytensuspensionen wurden dann mit 173 µM ^{14}C-Ölsäure : Albumin (1 : 1) bei 37°C in 1 ml PBS für 30 sec inkubiert. Die zelluläre Aufnahme wurde, wie unter "Methoden" beschrieben, bestimmt. Dargestellt sind initiale Aufnahmeraten (V_o) in Trypsin-vorbehandelten und nativen Hepatozyten. Der ^{14}C-Ölsäureeinstrom war nach Trypsinvorbehandlung der Zellen um 48,6 % vermindert. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD von 3 Wiederholungsexperimenten (Abb. 35).

Einfluß des pH-Wertes auf die initiale Aufnahme von ^{14}C-Ölsäure

Zur Bestimmung des Einflusses verschiedener pH-Werte wurden 0,96 µM ^{14}C-Ölsäure, frei in wässriger Lösung, mit dem Phosphatpuffersystem nach Soerensen (103) im pH-Bereich von 6,0 - 8,1 inkubiert (Abb. 36). Die maximale initiale Aufnahmerate lag bei pH 7,4.

Abbildung 36

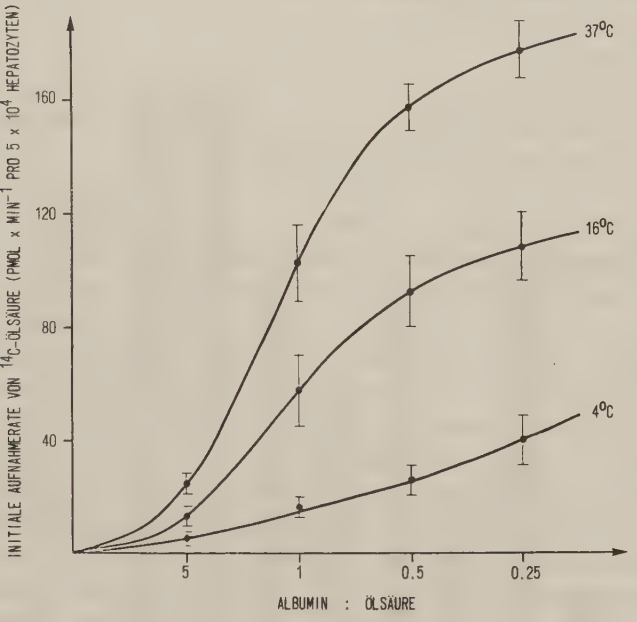


pH-Abhängigkeit der initialen ^{14}C-Ölsäureaufnahmerate. 250 µl der Hepatozytensuspension (2 x 10^6 Zellen / ml) wurden mit 0,96 µM ^{14}C-Ölsäure, frei in wässriger Lösung, in 650 µl des angegebenen Soerensen-Phosphatpuffersystems für 30 sec bei 37°C inkubiert. 100 µl des Inkubationsgemisches wurden unmittelbar danach in 1 ml Phloretin / 0,1 % BSA pipettiert, filtriert und gewaschen, wie unter "Methoden" beschrieben. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD von 3 Wiederholungsexperimenten.

Temperaturabhängigkeit der initialen ^{14}C-Ölsäureaufnahme

Die Ölsäureaufnahme war maximal bei 37°C. Bei 16°C war der Fettsäureeinstrom für alle untersuchten Albumin-Ölsäure Komplexe um 42,4 ± 2,6 % erniedrigt und bei 4°C um 80,0 ± 4,7 % reduziert (Abb. 37).

Abbildung 37



Legende zur Abbildung 37

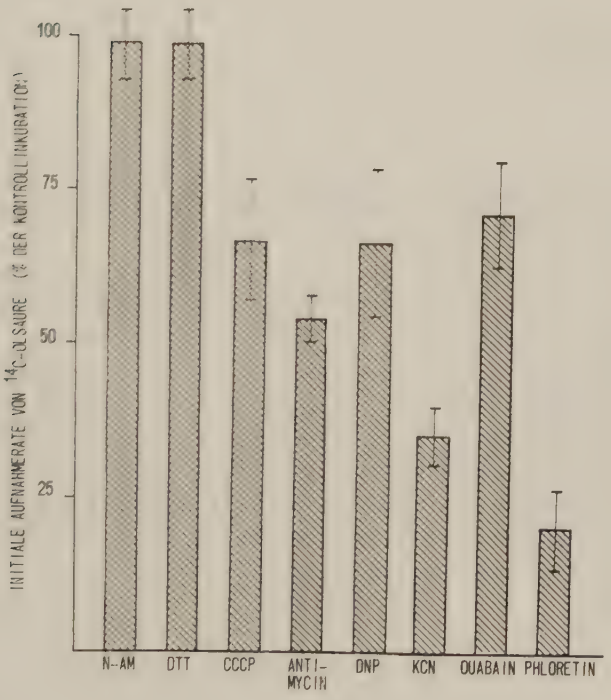
Temperaturabhängigkeit der initialen ^{14}C-Ölsäureaufnahmerate. 250 µl der Hepatozytensuspension (2×10^6 Zellen / ml) wurden mit 173 µM ^{14}C-Ölsäure, in unterschiedlichen molaren Verhältnissen an Albumin gebunden, in 1 ml PBS bei 4°, 16° und 37°C für 30 sec inkubiert. Die Inkubationen wurden, wie unter "Methoden" beschrieben, gestoppt. Für alle untersuchten Albumin-Ölsäure Komplexe war der Fettsäureeinstrom bei 37°C maximal, bei 16°C um 42,4 $\pm$ 2,6 % und bei 4°C um 80,0 $\pm$ 4,7 % vermindert. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD von 3 Wiederholungsexperimenten.

Wirkung metabolischer Inhibitoren auf den ^{14}C-Ölsäureeinstrom in isolierte Hepatozyten (Abb. 8).

Zur weiteren Charakterisierung des Fettsäuretransportes wurde der Einfluß verschiedener metabolischer Inhibitoren, die an unterschiedlichen Stellen des Zellstoffwechsels angreifen, untersucht. Phloretin, ein wirksamer Inhibitor zellulärer Transportprozesse (4, 64, 70) (s. Abb. 31) hemmte den Fettsäureeinstrom um 80,5 %. N-Äthylmaleimid, das mit funktionellen Gruppen von Aminosäuren kovalente Bindungen eingeht, und Dithiothreitol (DTT), das Disulfidbindungen von Proteinen reduziert, hatten keinen Einfluß auf die initiale Fettsäureaufnahme. Die Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, 2,4-Dinitrophenol (DNP) und Carbonylcyanid-m-Chlorphenylhydrazon (CCCP), ebenso wie die Inhibitoren der Atmungskette, Antimycin und KCN, hemmten dagegen die ^{14}C-Ölsäureaufnahme signifikant. Daher kann angenommen

werden, daß der zelluläre Einstrom von Fettsäuren ein energieabhängiger Prozeß ist. Da Ouabain, welches die membrangebundene Na^+ -K^+ ATPase hemmt, auch zu einer signifikanten Hemmung der Aufnahme führte, ist zu vermuten. daß der zelluläre Einstrom von Fettsäuren an die Aktivität der membrangebundenen Natrium-Kalium ATPase gekoppelt ist.

Abbildung 38



Legende zur Abbildung 38

Die Wirkung metabolischer Inhibitoren auf den ^{14}C-Ölsäureeinstrom in isolierte Hepatozyten. 100 µl der Hepatozytensuspension (2×10^6 Zellen / ml) wurden für 5 min bei 37°C mit 200 µM Phloretin, 200 mM N-Äthylmaleimid (N-ÄM), 1 mM Dithiothreitol (DTT), 1,6 mM 2,4-Dinitrophenol (DNP), 80 µg Antimycin, 20 µM Carbonylcyanid-m-Chlorphenylhydrazon (CCCP), 1 mM KCN oder 150 µM Ouabain in PBS, pH 7,4, inkubiert. Danach wurden 17 µM ^{14}C-Ölsäure : Albumin (1 : 1) hinzugefügt und für weitere 30 sec inkubiert. Die Kontrollhepatozytenpräparation enthielt anstatt der Inhibitoren PBS. Dargestellt ist die prozentuale Hemmung der initialen Aufnahmerate (V_o) im Vergleich zu den Kontrollinkubationen. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD von 3 Wiederholungsexperimenten.

Einfluß verschiedener Natrium- und Calciumkonzentrationen auf die initiale Aufnahme von ^{14}C-Ölsäure

Die initialen Aufnahmeraten von ^{14}C-Ölsäure wurden signifikant herabgesetzt, wenn Na^+ isoosmotisch durch K^+, Li^+ oder Saccharose ersetzt wurde (Tabelle 3A). Die Zunahme der Calciumkonzentration im Inkubationsmedium auf 5 oder 10 mM führte ebenfalls zu einer deutlichen Hemmung der Fettsäureaufnahme (Tabelle 3B). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die ^{14}C-Ölsäureaufnahme abhängig ist von der extrazellulären Natriumkonzentration und durch einen Calciumüberschuß gehemmt werden kann.

Tabelle 3

Einfluß der Natrium- und Calciumkonzentration auf den Einstrom von ^{14}C-Ölsäure in isolierte Hepatozyten. Die Zellen wurden dreimal gewaschen, bevor sie in 1 mM $NaHCO_3$ (pH 7,4) mit 143 mM NaCl, 110 mM KCl + 25 mM NaCl, 143 mM LiCl oder 286 mM Saccharose bzw. im zur Zellisolation verwendeteten Medium mit den angegebenen Calciumkonzentrationen resuspendiert wurden. 250 µl der Zellsuspensionen (2×10^6 Zellen / ml, Lebensfähigkeit über 90 %) wurden mit 173 µM ^{14}C-Ölsäure : Albumin (1 : 1) in 1 ml der jeweiligen Puffer, pH 7,4, für 30 sec bei 37°C inkubiert. Angegeben sind Mittelwerte ± SD von 3 Wiederholungsexperimenten.

	pmol ^{14}C-Ölsäure x min^{-1} pro 5 x 10^4 Hepatozyten
A: PUFFER MIT:	
143 mM NaCl	115,6 ± 10,7
110 mM KCl + 25 mM NaCl	74,9 ± 8,8
143 mM LiCl	57,0 ± 8,1
246 mM Saccharose	46,7 ± 7,2
B: CALCIUMKONZENTRATION:	
0 mM	123,6 ± 14,4
0,1 mM	123,0 ± 20,9
0,5 mM	127,1 ± 17,8
1 mM	122,8 ± 14,1
5 mM	94,4 ± 8,7
10 mM	86,0 ± 7,5

Aufnahme von ^{14}C-Ölsäure in Gegenwart anderer organischer Anionen

Die Spezifität des zellulären Aufnahmemechanismus für Fettsäuren wurde in Gegenwart verschiedener anderer Vertreter organischer Anionen, von welchen ein aktiver zellulärer Transport angenommen wird (108), untersucht. BSP, Taurocholsäure und Cholsäure wurden in Konzentrationen von 0,2 bis 40 µM zusammen mit 17 µM ^{14}C-Ölsäure : Albumin (1 : 1) und 100 µl der Hepatozytensuspension (2 x 10^6 Zellen / ml) für 30 sec bei 37°C inkubiert. Die initialen Aufnahmeraten der ^{14}C-Ölsäure wurden in keinem Fall signifikant verändert, sodaß angenommen werden muß, daß Fettsäuren durch einen eigenen Transportmechanismus in die Zellen aufgenommen werden.

3.7. Untersuchungen zur biologischen Signifikanz eines hepatozellulären Fettsäurerezeptors

In den vorangegangenen Untersuchungen fanden sich Hinweise für eine spezifische, energieabhängige Aufnahme von Fettsäuren in isolierte Hepatozyten (114) (s. 3.6.). In in vitro Untersuchungen mit isolierten Rattenleberplasmamembranen konnte nachgewiesen werden, daß ^{14}C-Ölsäure mit hoher Affinität an Membranbindungsstellen gebunden wurde (110) (s. 3.4.). Aus dem mit Triton X-100 gelösten Plasmamembranproteingemisch der Rattenleber ließ sich ein spezifisches Fettsäure bindendes Protein isolieren (112)(s. 3.4.). Mit einem Antikörper gegen dieses Membranprotein wurde die Bin-

dung von ^{14}C-Ölsäure an Rattenleberplasmamembranen selektiv gehemmt.

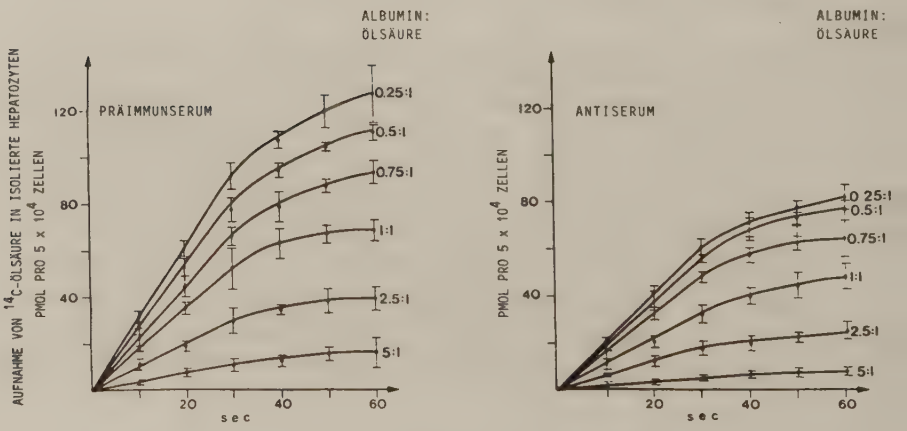
In dieser Untersuchung wurde versucht, die biologische Signifikanz des putativen Rezeptorproteins im in vivo Experiment zu belegen. Dazu wurde der Einfluß des Antikörpers gegen das Fettsäure bindende Membranprotein auf die Aufnahme von ^{14}C-Ölsäure in isolierte Hepatozyten untersucht. Die Zellen wurden dafür entweder mit der IgG-Fraktion des Antiserums gegen dieses Membranprotein oder als Kontrolle mit der IgG-Fraktion des Präimmunserums bzw. Anti-Rattenfibronectins vorbehandelt.

Mit Hilfe der schon in der vorangegangenen Untersuchung verwendeten 200 µM Phloretin / 0,1 % BSA-Stopplösung (s. 3.6.) wurde der hepatozelluläre Ein- und Ausstrom der untersuchten Liganden weitgehend gehemmt und alle an der Oberfläche der Zellen haftende Liganden entfernt. Dadurch war gewährleistet, daß nur die intrazellulär aufgenommene Radioaktivität gemessen wurde.

Zur Beeinflussung der freien Fettsäurekonzentration im Inkubationsmedium wurden 173 µM ^{14}C-Ölsäure so an BSA gebunden, daß das molare Verhältnis von Albumin : Ölsäure zwischen 5 : 1 und 0,25 : 1 variierte. Dadurch kann eine hyperbole Zunahme der freien Fettsäurekonzentration im wässrigen Medium erreicht werden (105), ohne die Löslichkeit der freien Fettsäuren zu überschreiten (24, 58). Die mit den IgG-Fraktionen vorbehandelten Hepatozyten zeigten über 30 sec eine maximale, lineare ^{14}C-Ölsäureaufnahme, welche hauptsächlich den zellulären Einstrom von Fettsäuren reprä-

sentierte (Abb. 39). Der anschließend beobachtete kontinuierliche Abfall der Aufnahmegeschwindigkeit bis zum 1 min-Wert ist durch beginnenden Ausstrom von intrazellulär ^{14}C-Ölsäure bedingt. Die Aufnahmerate zwischen 1 und 7 min war bedeutend langsamer als die initiale Aufnahmekomponente und stellt die durch Einstrom, Ausstrom und Stoffwechsel beeinflußte Nettoakkumulation von intrazellulären Fettsäuren dar (Abb. 40). Durch Vorbehandlung der Zellen mit dem Antiserum gegen das Fettsäure bindende Membranprotein konnte die Aufnahme aller ^{14}C-Ölsäure-Albumin Komplexe im Vergleich zu den mit Präimmunserum behandelten Hepatozyten signifikant gehemmt werden (Abb. 39, 40).

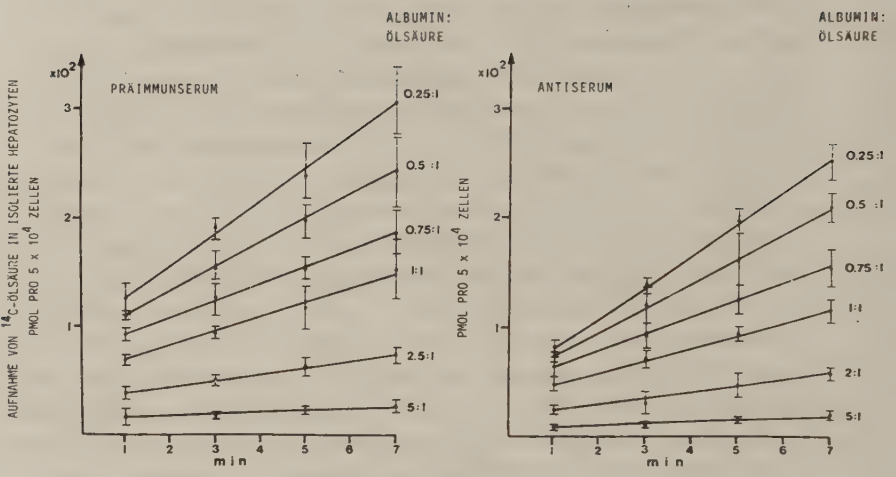
Abbildung 39



Legende zur Abbildung 39

Wirkung des Anti-Fettsäure bindenden Proteins auf die ^{14}C-Ölsäureaufnahme in isolierte Hepatozyten. Die Zellen wurden mit 400 µg der IgG-Fraktionen des Immunserums (rechts) bzw. des Präimmunserums (links) vorbehandelt (s. "Methoden"). 250 µl der Hepatozytensuspension (2×10^6 Zellen / ml) wurden mit 173 µM ^{14}C-Ölsäure, in verschiedenen molaren Verhältnissen an Albumin gebunden, in 1 ml PBS bei 37°C inkubiert. In 10 sec-Intervallen wurden 100 µl des Inkubationsgemisches in 1 ml 200 µM Phloretin / 0,1 % BSA (37°C) pipettiert, filtriert und gewaschen, wie unter "Methoden" beschrieben. Dargestellt sind die über 1 min gemessenen Aufnahmeraten. Für jeden individuellen Albumin-Ölsäure Komplex konnte nachgewiesen werden, daß die Aufnahme über 30 sec maximal und linear war. Die Aufnahmegeschwindigkeit war in mit Anti-Fettsäure bindendem Membranprotein vorbehandelten Hepatozyten signifikant verlangsamt. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD von 3 Wiederholungsexperimenten.

Abbildung 40

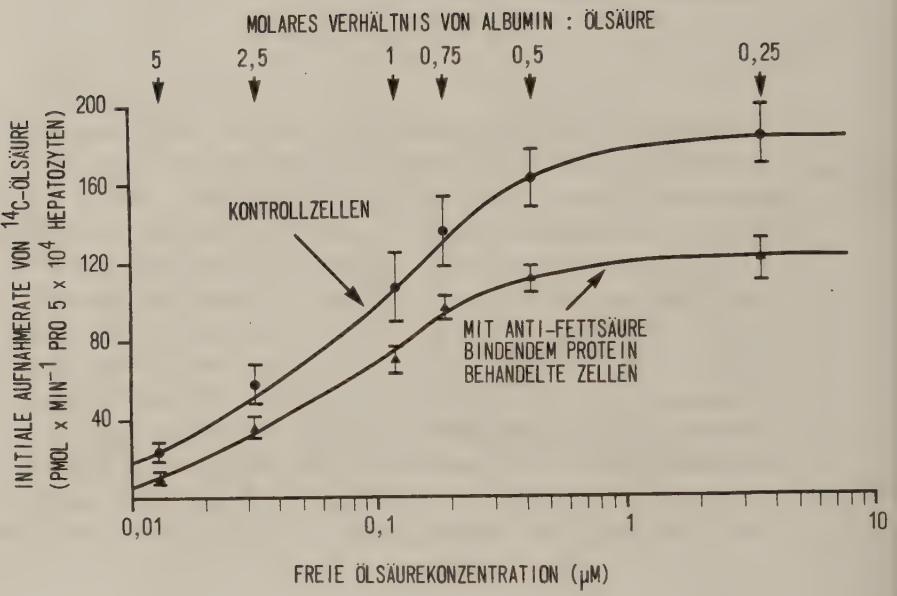


Wirkung des Anti-Fettsäure bindenden Proteins auf die ^{14}C-Ölsäureaufnahme in isolierte Hepatozyten. Dargestellt sind die Aufnahmeraten zwischen 1 und 7 min nach Inkubationsbeginn (Fortsetzung von Abb. 39). Die Nettoakkumulation jedes einzelnen Albumin : Ölsäure Komplexes ist wiederum linear, jedoch deutlich langsamer als die initiale Aufnahmekomponente. Obwohl die absoluten Mengen der aufgenommenen ^{14}C-Ölsäure aufgrund einer verminderten Einstromgeschwindigkeit (Abb. 39) in mit Anti-Fettsäure bindendem Membranprotein vorbehandelten Hepatozyten signifikant niedriger sind, ist

die Aufnahmerate pro Minute identisch mit der der Kontrollpräparation. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD von 3 Wiederholungsexperimenten (Abb. 40).

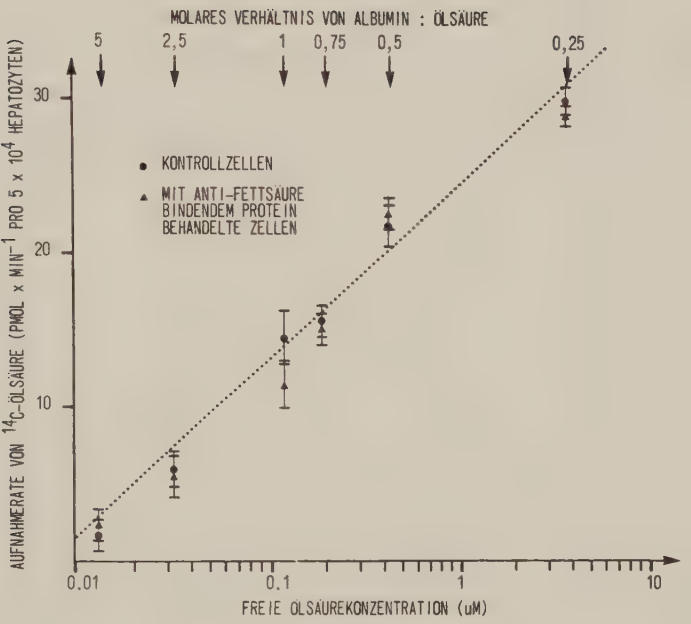
Zur Analyse der Antikörperwirkung auf die hepatozelluläre Aufnahmekinetik von ^{14}C-Ölsäure in Abhängigkeit von der extrazellulären Ligandkonzentration wurden in Abb. 41 und 42 die Aufnahmeraten gegen die berechneten (105, 133) freien Ölsäurekonzentrationen der jeweiligen Inkubationsansätze aufgetragen. In Abb. 41 zeigt der initiale Fettsäureeinstrom mit zunehmender Ligandkonzentration eine exponentielle Aufnahmekinetik, die typisch für sättigungsfähigen Transport ist. In den mit Anti-Fettsäure bindendem Membranprotein behandelten Hepatozyten ist der Transport signifikant gehemmt. Im Gegensatz dazu fand sich kein Einfluß des Antikörpers auf die zwischen 1 und 7 min beobachtete intrazelluläre Akkumulation von ^{14}C-Ölsäure (Abb. 42).

Abbildung 41



Wirkung des Anti-Fettsäure bindenden Membranproteins auf die initiale Aufnahme von ^{14}C-Ölsäure in isolierte Hepatozyten. Die Zellen wurden mit 400 µg der IgG-Fraktion des Immunserums (▲) bzw. des Präimmunserums als Kontrolle (•) vorbehandelt. Die initialen Aufnahmeraten sind gegen die berechneten freien Ölsäurekonzentrationen der jeweiligen Inkubationsansätze aufgetragen. Der ^{14}C-Ölsäureeinstrom wird durch das Anti-Fettsäure bindende Membranprotein deutlich gehemmt. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD von 3 Wiederholungsexperimenten.

Abbildung 42



Wirkung des Anti-Fettsäure bindenden Membranproteins auf die Aufnahmerate von ^{14}C-Ölsäure zwischen 1 und 7 min nach Inkubationsbeginn. Die Zellen wurden mit 400 µg der IgG-Fraktion des Immunserums (▲) bzw. des Präimmunserums als Kontrolle (•) vorbehandelt. Es findet sich kein signifikanter Unterschied der Aufnahmegeschwindigkeit in den beiden Hepatozytenpräparationen. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD von 3 Wiederholungsexperimenten.

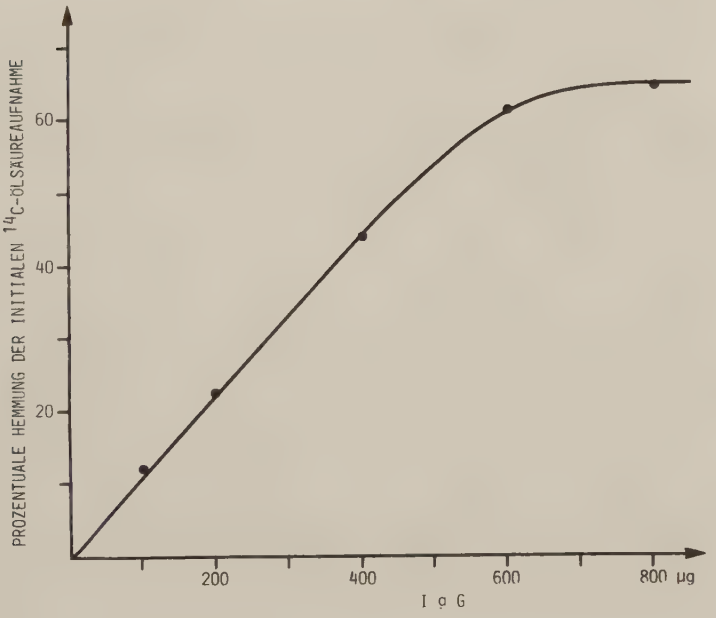
Tabelle 4

Wirkung des Anti-Fettsäure bindenden Membranproteins auf die ^{14}C-Ölsäureaufnahme in isolierte Hepatozyten. Die Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen (100 - 800 µg) der IgG-Fraktionen des Immunserums, Präimmunserums oder Anti-Rattenfibronectins inkubiert. 250 µl der Zellsuspensionen (2×10^6 Zellen / ml) wurden mit 173 µM ^{14}C-Ölsäure : Albumin (1 : 1) bei 37°C in 1 ml PBS inkubiert. Nach 30 sec wurden 100 µl des Inkubationsgemisches in 1 ml 200 µM Phloretin / 0,1 % BSA (37°C) pipettiert, filtriert und gewaschen. Angegeben sind Mittelwerte ± SD von 3 Wiederholungsexperimenten.

Einstrom von ^{14}C-Ölsäure (pmol x min^{-1} pro 5 x 10^4 Hepatozyten)					
IgG-Konzentration	100 µg	200 µg	400 µg	600 µg	800 µg
Immunserum	92,1 ± 7,6	81,3 ± 6,8	58,8 ± 4,9	40,2 ± 6,8	36,8 ± 5,7
Präimmunserum	105,3 ± 14,8	103,3 ± 14,7	106,0 ± 17,4	103,7 ± 6,7	105,3 ± 10,1
Anti-Fibronectin	102,3 ± 19,3	102,3 ± 12,7	105,0 ± 9,8	107,0 ± 22,5	106,7 ± 13,8

Vorbehandlung der Hepatozyten mit ansteigenden Konzentrationen der IgG-Fraktionen (100 - 800 µg) des Antiserums, des Präimmunserums oder des Anti-Rattenfibronectins, als zusätzlicher Kontrolle, führte zu einer exponentiell zunehmenden Hemmung der initialen ^{14}C-Ölsäureaufnahme durch das Anti-Fettsäure bindende Protein. Die IgG-Fraktionen des Präimmunserums oder des Anti-Rattenfibronectins hatten keinen Einfluß auf die zelluläre Fettsäureaufnahme (Tabelle 4, Abb. 43).

Abbildung 43

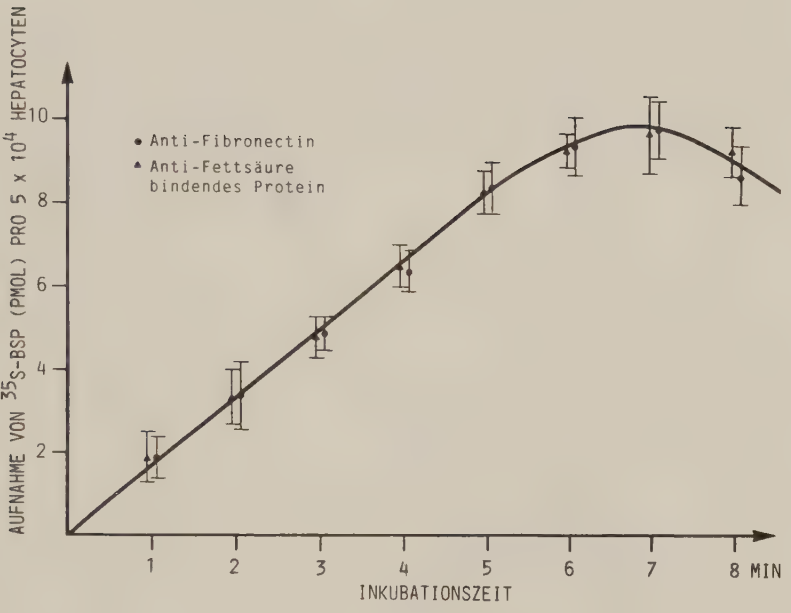


Legende zur Abbildung 43

Hemmung der ^{14}C-Ölsäureaufnahme in isolierte Hepatozyten durch das Anti-Fettsäure bindende Membranprotein. Die Abbildung bezieht sich auf die in Tabelle 4 gezeigten Ergebnisse. Dargestellt ist die prozentuale Hemmung des ^{14}C-Ölsäureeinstromes durch das Anti-Fettsäure bindende Membranprotein im Vergleich zu den Kontrollen (Präimmunserum und Anti-Fibronectin: 104 $\pm$ 1,7 pmol x min^{-1} pro 5 x 10^4 Hepatozyten) als Funktion der zugefügten IgG-Konzentration.

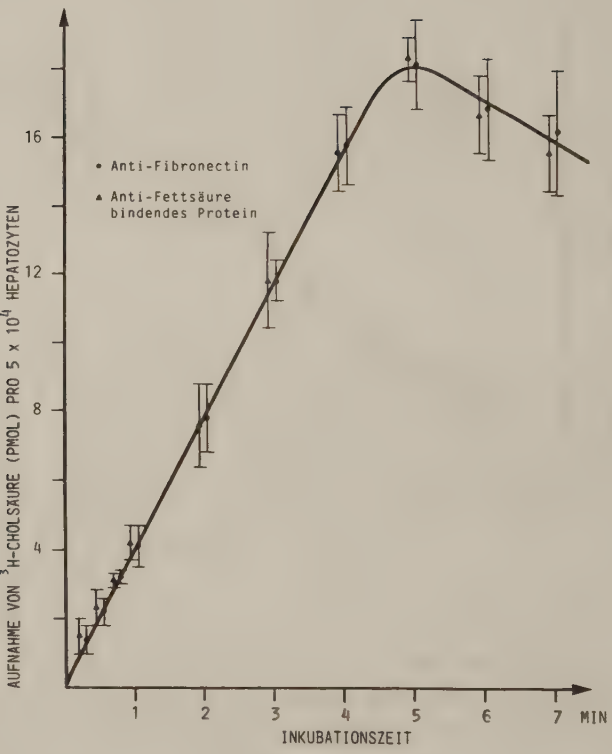
Die Spezifität des Anti-Fettsäure bindenden Membranproteins wurde durch Inkubation der vorbehandelten Hepatozyten mit Vertretern verschiedener Klassen organischer Anionen untersucht (Abb. 44, 45, 46). In Voruntersuchungen wurde gezeigt, daß nach fünfminütiger Inkubation von ansteigenden Konzentrationen eines jeden dieser Liganden die maximale zelluläre Aufnahme bei folgenden Konzentrationen erreicht war: 8,9 µM ^{35}S-BSP : BSA (1 : 2); 150 µM ^{3}H-Cholsäure : BSA (1 : 2); 750 µM ^{14}C-Taurocholsäure : BSA (1 : 1). Die Anwesenheit von Albumin in allen Inkubationsmedien reduzierte die unspezifische, zellgebundene Radioaktivität und erhöhte damit die Empfindlichkeit des Inkubationssystems zum Nachweis einer Antikörper-bedingten Hemmung der zellulären Aufnahme. Der Einstrom aller Liganden war maximal und linear für 5 min und fiel danach durch beginnenden Ausstrom der Liganden ab. Die Aufnahmeraten der untersuchten Liganden waren in den mit dem Anti-Fettsäure bindenden Membranprotein und Anti-Fibronectin behandelten Hepatozyten nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 44, 45, 46).

Abbildung 44



Einfluß des Anti-Fettsäure bindenden Membranproteins auf die Aufnahme von ^{35}S-BSP in isolierte Hepatozyten. Verglichen wurden die Zellen, die mit 400 µg der IgG-Fraktion des Immunserums (▲) bzw. des Anti-Fibronectins (•) vorbehandelt wurden. 250 µl dieser Zellsuspensionen wurden mit 8,9 µM ^{35}S-BSP : Albumin (1 : 2) bei 37°C in 1 ml PBS inkubiert. Nach den angegebenen Zeitintervallen wurden jeweils 100 µl der Inkubationsgemische in 1 ml 200 µM Phloretin / 0,1 % BSA pipettiert, filtriert und gewaschen, wie unter "Methoden" beschrieben. Die Aufnahmerate von ^{35}S-BSP in die beiden Zellpräparationen war identisch. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD von 3 Wiederholungexperimenten.

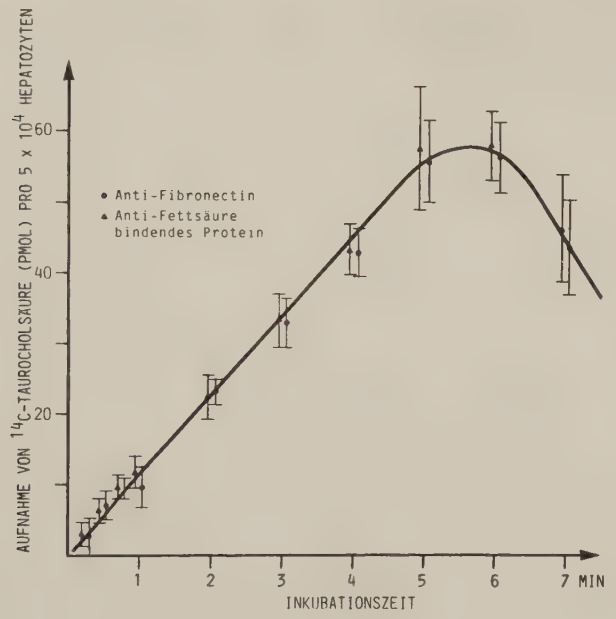
Abbildung 45



Einfluß des Anti-Fettsäure bindenden Membranproteins auf die Aufnahme von ^{3}H-Cholsäure in isolierte Hepatozyten. Verglichen wurden die Zellen, die mit 400 µg der IgG-Fraktion des Immunserums (▲) bzw. des Anti-Fibronectins (•)vorbehandelt wurden. 200 µl dieser Suspensionen wurden mit 150 µM ^{3}H-Chol-

säure : Albumin (1 : 2) bei 37°C in 1 ml PBS inkubiert. Nach den angebenen Zeitintervallen wurden jeweils 100 µl der Inkubationsgemische in 1 ml 200 µM Phloretin / 0,1 % BSA pipettiert, filtriert und gewaschen, wie unter "Methoden" beschrieben. Die Aufnahme von ^{3}H-Cholsäure in die beiden Zellpräparationen war identisch. Angegeben sind Mittelwerte ± SD von 3 Wiederholungsexperimenten (Abb. 45).

Abbildung 46



Legende zur Abbildung 46

Einfluß des Anti-Fettsäure bindenden Membranproteins auf die Aufnahme von ^{14}C-Taurocholsäure in isolierte Hepatozyten. Verglichen wurden die Zellen, die mit 400 µg der IgG-Fraktion des Immunserums (▲) bzw. des Anti-Fibronectins (•) vorbehandelt wurden. 250 µl dieser Zellsuspensionen wurden mit 750 µM ^{14}C-Taurocholsäure : Albumin (1 : 1) bei 37°C in 1 ml PBS inkubiert. Nach den angegebenen Zeitintervallen wurden jeweils 100 µl der Inkubationsgemische in 1 ml 200 µM Phloretin / 0,1 % BSA pipettiert, filtriert und gewaschen, wie unter "Methoden" beschrieben. Die Aufnahme von ^{14}C-Taurocholsäure in die beiden Zellpräparationen war identisch. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD von 3 Wiederholungsexperimenten.

4. Diskussion

Der Bilirubintransport vom Blutstrom in die Galle geschieht in vier, voneinander abhängigen Schritten: 1. Initiale Aufnahme in die Leberzelle; 2. Bindung an spezifische, intrazelluläre Makromoleküle, besonders Ligandin; 3. Konjugation mit Glykosiden und 4. Biliäre Ausscheidung (108). Ähnliche Prozesse bewirken den intrahepatischen Transport einiger (anionischer) Medikamente, Hormone, Karzinogene und exogen zugeführter Farbstoffe (z.B. Bromsulphthalein oder Indozyanin Grün), die zur Beurteilung der Leberfunktion herangezogen werden (96). Die Erforschung der bisher noch weitgehend unbekannten molekularbiologischen Vorgänge des hepatozellulären Transports dient dem Verständnis der Pathophysiologie klinischer Symptome, wie z.B. Neugeborenen- und Schwangerschaftsikterus oder angeborener Hyperbilirubinämiesyndrome. Bilirubin gehört ebenso wie Fettsäuren und Gallensäuren zu der Gruppe der organischen Anionen, deren hepatozellulärer Transport eine lebenswichtige Hauptaufgabe der Leber darstellt und bei Lebererkrankungen oft beeinträchtigt ist. In dieser Arbeit sollte ein Beitrag zur Klärung des Aufnahmeprozesses dieser Substanzen in die Leberzelle geleistet werden. Da diese drei Klassen organischer Anionen rasch und mit hoher Extraktionsrate von der Leber aufgenommen werden (6, 43, 60, 62, 85, 90, 129), wurden spezifische Transportmechanismen für diese Substanzen vermutet. Aufgrund ihrer festen Bindung an Serumalbumin und der Beobachtung, daß Albumin nicht zusammen mit dem Liganden in die Zelle aufgenommen wird (14, 16, 43, 44, 45, 85, 129), ist eine beschleunigte Dissoziation dieser Albumin-Ligand Komplexe an oder in der Nähe der Leberzellplasmamembran zu fordern. Auf der Grundlage kinetischer Untersuchungen zur Analyse der Ölsäure-, BSP- und Bilirubin-Aufnahme in

Abhängigkeit von der Albuminkonzentration wurde vermutet, daß ein spezifischer hepatozellulärer Rezeptor für Albumin die Dissoziation der Albumin-Ligand Komplexe und anschließende Aufnahme der Liganden in die Leber bewerkstelligt (123, 124). Das Konzept eines spezifischen Membranrezeptors beinhaltet bestimmte Charakteristika der Rezeptor-Ligand Interaktion, wie hohe Affinität, einer Sättigungskinetik entsprechende Bindung, Gewebsspezifität und Verlust der Rezeptor : Ligand Affinität nach Denaturierung der Membranen (25, 53). Ein weiteres Kriterium ist der Nachweis eines spezifischen Ligand bindenden Membranproteins. Deshalb wurde zur Untersuchung der Hypothese, daß an Albumin gebundene Substanzen mit Hilfe eines spezifischen Albuminrezeptors in die Leberzelle aufgenommen werden, die Bindung von nativem und entfettetem, ^{125}J-markiertem, monomerem Rattenalbumin an isolierte sinusoidale Rattenleberplasmamembranen untersucht (s. 3.1.). Nach 30-minütiger Inkubation war jedoch nur weniger als 0,5 % der eingesetzten ^{125}J-Albuminmenge mit den Membranen assoziiert. Die Bindung an Rattenleberplasmamembranen war nicht höher als an Erythrozytenmembranen und konnte durch einen Überschuß von unmarkiertem Rattenalbumin nicht reduziert werden. Ebenso zeigte Hitzedenaturierung der Leberplasmamembranen keinen Einfluß auf die Bindung. Um auszuschließen, daß der fehlende Nachweis spezifischer Bindung durch eine zu schnelle Dissoziationszeit hervorgerufen wird, wurde eine Photoaffinitätsprobe, die die kovalente Bindung von Ligand-Rezeptorpaaren bewerkstelligt, eingesetzt. Auch unter diesen Bedingungen wurde die Menge des an Leberplasmamembranen gebundenen ^{125}J-markierten Albumins nicht erhöht. Schließlich ergab auch die Affinitätschromatographie des gelösten Membranproteingemisches über ein Albumin-Agarosegel keinen Anhalt für ein Membranprotein mit hoher Affinität für Albumin. Trotz fehlender Hinweise für die Existenz eines Albuminrezep-

tors im klassischen Sinn bestätigten mehrere Untersuchungen das Konzept, daß die Dissoziation der Ligand-Albumin Komplexe an der Leberzellplasmamembran unerwartet schnell erfolgt (35, 36, 37, 107, 125). Die genaue Natur dieses Prozesses ist noch ungeklärt. Diskutiert wurden Verschiebungen des pH-Wertes an der Zelloberfläche oder unterschiedliche Fließgeschwindigkeit der Extrazellulärflüssigkeit im Diss'schen Raum im Vergleich zum sinusoidalen Raum. Auch wäre denkbar, daß spezifische Rezeptoren mit hoher Affinität für die an Albumin gebundenen organischen Anionen die Dissoziation vom Albuminmolekül beschleunigen und ihre intrazelluläre Aufnahme bewirken. Deshalb wurde untersucht, ob spezifische Bindungsproteine mit hoher Affinität für die drei Hauptklassen organischer Anionen (Bilirubin und verwandte cholephile Substanzen, Gallensäuren und Fettsäuren) auf der Leberplasmamembran vorhanden sind.

Bilirubin und BSP sind Vertreter einer Klasse dieser organischen Anionen. Wie bereits unter 1.1.1. dargestellt, weisen kinetische Untersuchungen ihrer hepatozellulären Aufnahme am Ganztier (45, 95), an der isoliert perfundierten Rattenleber (85) und an isolierten Hepatozyten (63, 121) auf die Existenz eines in der Plasmamembran vorhandenen Transportmechanismus hin, welcher von beiden Substanzen benutzt wird. Untersuchungen mit isolierten Rattenleberplasmamembranen zeigten die spezifische Bindung von BSP an eine Bindungsstelle mit hoher Affinität (92). Dieses scheinbar physiologische Bindungsverhalten wurde jedoch sehr in Frage gestellt, als Merkmale der "spezifischen" Bindung auch mit synthetisch hergestellten, proteinfreien Liposomen nachgeahmt werden konnten (130). Die Unsicherheit bezüglich der Existenz eines Bilirubin / BSP Membrantransportsystems wurde noch verstärkt, nachdem drei verschiedene Arbeitsgruppen über die Isolation eines potentiellen Rezeptorproteins mit Molekulargewichten von 55.000

(131), 60.000 (91) und 100.000 (68) Dalton berichteten. Deshalb sollte in der jetzigen Untersuchung das putative Bilirubin / BSP bindende Protein aus Rattenleberplasmamembranen erneut isoliert, weiter physikochemisch analysiert und mit anderen bereits beschriebenen (68, 91, 131) Bindungsproteinen verglichen werden. Mit einem Antikörper gegen dieses Protein sollte seine Bedeutung im Bindungsprozeß organischer Anionen an Leberplasmamembranen analysiert werden (s. 3.2.).

Aus dem durch Triton X-100 Vorbehandlung gewonnenen Proteinextrakt von Rattenleberplasmamembranen konnte mittels Affinitätschromatographie über Bilirubin- und BSP-Agarose je ein Protein mit hoher Affinität für Bilirubin und BSP isoliert werden. Die von beiden Affinitätschromatographiesäulen isolierten Proteine erschienen nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) als einzelne Banden mit einem Molekulargewicht von 55.000 Dalton und co-chromatographierten nach Gelfiltration auf Sephadex G-75 sowohl mit ^{14}C-Bilirubin als auch mit ^{35}S-BSP. Sowohl Gradienten-PAGE ohne SDS als auch Gelfiltration auf Sephadex G-150 zeigten, daß es sich bei dem nativen BSP / Bilirubin bindenden Protein um ein dimeres Molekül mit 55.000 Dalton Untereinheiten handelt. Es hatte einen isoelektrischen Punkt von pH 3,5 und konnte mit PAS, jedoch nicht mit Sudan Schwarz gefärbt werden. Ein im Kaninchen produzierter Antikörper gegen das BSP bindende Membranprotein zeigte im doppelten Immundiffusionstest eine Identitätspräzipitationslinie sowohl mit dem BSP- als auch mit dem Bilirubin bindenden Protein. Ferner konnte Identität mit dem von Wolkoff und Chung (91) isolierten organische Anionen bindenden Protein nachgewiesen werden. Mit diesem spezifischen Antikörper konnte die Bindung von ^{14}C-Bilirubin und ^{35}S-BSP, jedoch nicht von ^{14}C-Ölsäure und ^{14}C-Taurocholsäure an Rattenleberplasmamembranen gehemmt werden. Immunhistologische Untersuchungen wiesen das

BSP / Bilirubin bindende Protein als Bestandteil aller drei Plasmamembrananteile der Rattenhepatozyten nach. Es fand sich weder in anderen Zellpopulationen der normalen Rattenleber noch in anderen Organen. Die Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, daß ein spezifisches Leberzellplasmamembranprotein an der hepatozellulären Aufnahme von Bilirubin und BSP beteiligt ist.
Daneben gelang es, auch aus menschlichem Plazentagewebe ein BSP / Bilirubin bindendes Membranprotein mit ähnlichen Merkmalen zu isolieren (s. 3.3.). Dies ist als ein erster Hinweis dafür anzusehen, daß der zelluläre Transport von Bilirubin und verwandten cholephilen Anionen auch beim Menschen durch ein membrangebundenes Carriersystem vermittelt wird. Diese Beobachtung ist von potentiellem Interesse in Hinblick auf weiterführende Untersuchungen, z.B. zur Pathogenese von Hyperbilirubinämien.

Eine andere Hauptklasse organischer Anionen, die Gallensäuren, scheinen ebenfalls mit einem spezifischen, Rezeptor vermittelten Transportsystem in die Leberzellen aufgenommen zu werden (3, 20, 33, 60). Levy und Mitarbeiter konnten als erste ein einzelnes Gallensäuren bindendes Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 54.000 Dalton isolieren (66). In eigenen vorläufigen Untersuchungen gelang es mit Hilfe der Glykocholsäure-Agarose Affinitätschromatographie ebenfalls, ein 54.000 Dalton Gallensäuren bindendes Protein aus Rattenleberplasmamembranen darzustellen (13). Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung dieses Proteins stehen noch aus.

Fettsäuren stellen eine weitere Klasse organischer Anionen dar, die im Serum fest an Albumin gebunden transportiert werden. Langläufig wird davon ausgegangen, daß die Aufnahme von Fettsäuren in die Leber durch passive Diffusion erfolgt (47, 61, 106). In Untersuchungen an embryonalen Herzzellen des Huhnes (81, 93) und Rattenadipozyten (1, 2) fanden sich jedoch bereits Hinweise für einen sättigungsfähigen zellulären Aufnahmeprozeß. Zudem konnte in

Trypsin-vorbehandelten Hepatozyten eine Hemmung der Fettsäureoxidation festgestellt werden (71). Ob diese Phänomene jedoch für einen aktiven zellulären Transport sprechen oder nur Ausdruck des intrazellulären Stoffwechsels sind (26, 27), war umstritten.

Zur Klärung des hepatozellulären Aufnahmemechanismus von Fettsäuren wurde zunächst das Bindungsverhalten einer repräsentativen Fettsäure, ^{14}C-Ölsäure, an Rattenleberplasmamembranen unter verschiedenen Bedingungen in vitro untersucht. In proteinfreien Inkubationsgemischen konnte nachgewiesen werden, daß die Bindung sättigungsfähig ist, gehemmt wird durch einen Überschuß nicht radioaktiver Ölsäure, fast aufgehoben wird durch Hitzedenaturierung der Membranen und reversibel ist durch Postinkubation mit einem Überschuß nicht radioaktiv markierter Fettsäure oder Albumin. Das Temperaturoptimum lag bei 37°C. Wenn ^{14}C-Ölsäure in Gegenwart von Albumin oder ß-Lactoglobulin inkubiert wurde, konnte gezeigt werden, daß die Menge der an Leberplasmamembranen gebundenen Ölsäure von der berechneten freien Ölsäurekonzentration im Inkubationsgemisch abhängig war. Trypsin-Vorbehandlung der Membranen hemmte die Ölsäurebindung signifikant. Die Analyse der Bindungskinetik ergab 10^{15} Bindungsstellen pro mg Membranprotein mit einer Affinität für Ölsäure von $K_{av} = 2 \times 10^{8}\ M^{-1}$. Durch Inkubation von ^{14}C-Ölsäure : Albuminkomplexen (molares Verhältnis 0,25 : 1 bis 5 : 1) mit nativen und hitzedenaturierten Rattenleberplasmamembranen ließ sich zwischen spezifischer und unspezifischer Membranbindung differenzieren. Die maximale spezifische Bindungskapazität betrug unter diesen experimentellen Bedingungen 3,2 nmol/mg Membranprotein.

Mit Hilfe der Affinitätschromatographie über Ölsäure-Agarose konnte ein einzelnes Protein mit hoher Affinität für Ölsäure aus dem mit Triton X-100 gelösten Membranproteingemisch isoliert werden. Dieses Sudan Schwarz / PAS-negative Protein hatte einen isoelektrischen Punkt von 9,0 und sein Molekulargewicht betrug sowohl nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese als auch nach Sephadex Gelchromatographie 40.000 Dalton. Das Protein co-chromatographierte auf Sephadex G-100 mit ^{14}C-Ölsäure, -Palmitinsäure, -Arachidonsäure, -Linolensäure, jedoch nicht mit ^{14}C-Ölsäurecholesterinester, -Phosphatidylcholin, -Taurocholsäure, -Bilirubin oder ^{35}S-BSP. Ein Kaninchenantikörper gegen das Fettsäure bindende Protein reagierte im Ouchterlony-Immundiffusionstest mit einer einzelnen Identitätspräzipitationslinie mit dem gereinigten Antigen und dem gelösten Leberplasmamembran-Proteingemisch. Keine Reaktivität zeigte sich mit dem BSP / Bilirubin bindenden Membranprotein, Rattenalbumin, Rattenserum und angereichertem Rattenleberzytosol. Der Antikörper gegen das Fettsäure bindende Protein hemmte die spezifische Bindung von ^{14}C-Ölsäure an Rattenleberplasmamembranen, während die Bindung von ^{14}C-Taurocholsäure und ^{35}S-BSP unbeeinflußt blieb. In immunhistochemischen Untersuchungen konnte das Fettsäure bindende Protein in den sinusoidalen und lateralen Plasmamembrananteilen der Hepatozyten sowie in den Glanzstreifen des Myokards und der Bürstensaummembran des oberen Dünndarms nachgewiesen werden.

Nachdem gezeigt wurde, daß Fettsäuren mit einem spezifischen Bindungsprotein an Rattenleberplasmamembranen gebunden werden, stellte sich die Frage, ob auch die intestinale

Resorption von Fettsäuren durch einen spezifischen Rezeptor reguliert wird. Dazu wurde die Bindung von Fettsäuren an isolierte mikrovillöse Membranen des Rattenjejunums in vitro untersucht (s. 3.5.).

Die Membranbindung von ^{14}C-Ölsäure zeigte ein Temperaturoptimum bei 37°C, war reversibel in Gegenwart eines 1.000-fachen Überschusses nicht radioaktiver Ölsäure und konnte durch Trypsinvorbehandlung und Hitzedenaturierung der Membranen weitgehend aufgehoben werden. Durch Inkubation ansteigender Konzentrationen von ^{14}C-Ölsäure, entweder frei in wässriger Lösung oder in verschiedenen molaren Verhältnissen an Albumin gebunden, gelang es, eine sättigungsfähige Bindungskinetik nachzuweisen. Nach Abzug der unspezifischen ^{14}C-Ölsäurebindung, die durch Inkubation mit hitzedenaturierten mikrovillösen Membranen bestimmt wurde, betrug die maximale spezifische Bindungskapazität 4,6 nmol/mg Membranprotein ($K_D = 1{,}5 \times 10^{-8}$ M). ^{14}C-Taurocholsäure und ^{35}S-BSP zeigten keine spezifische Bindung.

Mit Hilfe der Affinitätschromatographie über Ölsäure-Agarose ließ sich aus dem mit Triton X-100 gelösten Plasmamembranproteingemisch ein einzelnes Fettsäure bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 40.000 Dalton isolieren. Dieses Sudan Schwarz- und PAS-negative Protein cochromatographierte auf Sephadex G-100 mit verschiedenen langkettigen freien Fettsäure, zeigte aber keine Affinität für andere, Fettsäure enthaltende, komplexe Lipide, BSP oder Taurocholsäure. Mit einem Antikörper gegen das Fettsäure bindende Membranprotein der Rattenleber ließ sich die Identität des jejunalen und hepatischen Membranproteins demonstrieren. Es war weder im Serum noch als Bestandteil der zytoplasmatischen Proteine nachweisbar. Der Antikörper gegen das Fettsäure bindende Membranprotein hemmte die spezi-

fische Bindung von ^{14}C-Ölsäure an mikrovillöse Membranen, während die unspezifische Bindung an hitzedenaturierte Membranen unbeeinflußt blieb. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wiesen das Protein als Bestandteil der apikalen und lateralen Anteile (Region der "tight junctions") der Mukosaplasmamembranen des Jejunums nach, während es auf der luminalen Oberfläche von Ösophagus und Colon nicht vorhanden war. Die Ergebnisse sind mit Hypothese vereinbar, daß ein spezifischer Rezeptor die Fettsäureresorption aus dem Gastrointestinaltrakt vermittelt.

Der Nachweis spezifischer Fettsäurebindung an isolierte Rattenleberplasmamembranen und die Isolation eines potentiellen Rezeptorproteins wies auf ein Carrier vermitteltes Transportsystem hin. Daraufhin wurde in in vivo Untersuchungen an isolierten Rattenhepatozyten die Aufnahmekinetik von Fettsäuren untersucht (s. 3.6.).
Eine kritische Voraussetzung dieser Studie war, daß nur die in die Zelle aufgenommene ^{14}C-Ölsäure gemessen wurde und daß nach Inkubationsende keine Radioaktivität in das Medium abgegeben wurde. Dies wurde durch Verwendung von 200 µM Phloretin / 0,1 % BSA als Stopplösung gewährleistet (Abb. 21). Da in den meisten vorangegangenen Untersuchungen zum zellulären Fettsäuretransport der Fettsäurestoffwechsel in die Messung der Aufnahmekomponente mit einging, blieb es unklar, ob die beobachtete Sättigungsfähigkeit Ausdruck des zellulären Transportes oder des Stoffwechsels war. Deshalb wurden in dieser Untersuchung insbesondere die initialen Aufnahmeraten von Fettsäuren untersucht. Diese waren in den ersten 30 sec maximal und linear (Einstrom) und fielen danach ab als Ausdruck des beginnenden Ausstroms von unveresterten intrazellulären Fettsäuren. Die Sättigungsfähig-

keit des initialen Fettsäureeinstroms, als wichtigster Determinante eines Rezeptor vermittelten Transportsystems, wurde durch Inkubation von 173 µM ^{14}C-Ölsäure - in absteigenden molaren Verhältnissen an Albumin gebunden - untersucht. Dadurch wurde ein hyperbolischer Anstieg der freien, für die zelluläre Aufnahme zur Verfügung stehenden Ölsäurekonzentration erreicht. Die Beobachtung einer exponentiellen initialen Aufnahmekinetik wies auf einen sättigungsfähigen Transportmechanismus hin (K_m = 8,9 x 10^{-8} M). Die maximale Aufnahmerate der ^{14}C-Ölsäure betrug 2,7 nmol / 10^6 Zellen / min. Die Hemmung des Fettsäureeinstroms durch Trypsinvorbehandlung der Hepatozyten bestätigte die Hypothese, daß die Aufnahme durch ein spezifisches Transportprotein vermittelt wird. Weitere Merkmale der initialen hepatozellulären ^{14}C-Ölsäureaufnahme waren: Reversibilität durch Postinkubation mit einem Überschuß von Albumin, Hemmbarkeit durch Phloretin- und Calciumkonzentrationen über 5 mM, ein pH-Optimum von 7,4 und ein Temperaturoptimum von 37°C. Der deutliche Abfall der Einstromrate bei 4°C wies auf einen energieabhängigen Transport hin. Diese Vermutung wurde unterstützt durch die beobachtete Hemmung der Fettsäureaufnahme in Anwesenheit von Inhibitoren der Atmungskette und Entklopplern der oxidativen Phosphorylierung. Der Abfall der initialen Aufnahmegeschwindigkeit durch Ouabain bzw. Erniedrigung der Natriumkonzentration im Medium könnte damit erklärt werden, daß der zelluläre Einstrom von Fettsäuren an die Aktivität der membrangebundenen Na^+-K^+ ATPase gekoppelt ist. Ansteigende Konzentrationen von BSP, Taurocholsäure und Cholsäure, als Vertreter verschiedener Klassen organischer Anionen, hatten keinen Einfluß auf den ^{14}C-Ölsäureeinstrom in die Zellen - ein Indiz für die Spezifität des Fettsäuretransportsystems. Diese Ergebnisse weisen

auf die Existenz eines spezifischen, aktiven, Rezeptor vermittelten Transportmechanismus für Fettsäuren hin, der möglicherweise an die membrangebundene Na^+-K^+ ATPase gekoppelt ist.

Um die biologische Signifikanz des putativen Rezeptorproteins im in vivo Experiment zu belegen, wurde der Einfluß des Antikörpers gegen das Fettsäure bindende Membranprotein auf die Aufnahme von ^{14}C-Ölsäure in isolierte Hepatozyten untersucht (s. 3.9.). Dabei zeigte sich, daß der hepatozelluläre Fettsäureeinstrom gehemmt wird. Mit ansteigenden Konzentrationen des Antikörpers nahm die Hemmung der Aufnahme exponentiell zu. Der Transport verschiedener anderer organischer Anionen wurde durch den Antikörper nicht beeinträchtigt. Diese im vivo-System isolierter Hepatozyten gefundenen Ergebnisse bestätigen die Hypothese, daß die hepatozelluläre Aufnahme von Fettsäuren hauptsächlich durch das vorher identifizierte und isolierte (s. 3.4.) Fettsäure-Rezeptorprotein in Rattenleberplasmamembranen vermittelt wird.

Die dargestellten Untersuchungen erlauben die Schlußfolgerung, daß die hepatozelluläre Aufnahme von Fettsäuren, Gallensäuren sowie von anderen gallegängigen Substanzen wie Bilirubin und Bromsulphthalein durch substanzspezifische, jedoch biologisch analoge Trägerproteine vermittelt wird. Für jede Klasse von organischen Anionen ist ein Membranprotein isoliert und teilweise charakterisiert worden. Bisher konnte jedoch nur für das Fettsäure bindende Membranprotein der Beweis seiner physiologischen Funktion geführt werden. Die bioligische Ähnlichkeit der Transportmechanismen dieser drei Anionengruppen wird noch durch die Existenz gruppenspezifischer, cytosolischer

Bindungsproteine unterstrichen. Ihre Bedeutung scheint darin zu liegen, den spezifischen Liganden vom entsprechenden Rezeptor zu übernehmen. Der Mechanismus dieser Aufnahmeprozesse kann zum Verständnis der gestörten Gallesekretion, z.B. als Ursache des Ikterus bei verschiedenen Lebererkrankungen, aber auch des postulierten Aufnahmedefektes beim M. Gilbert-Meulengracht oder Rotor Syndrom (13) beitragen. Die Isolation potentieller Rezeptorproteine für organische Anionen ist der erste Schritt zum Nachweis möglicher Defekte von zellulären Aufnahmeprozessen, z. B. Hyperbilirubinämien.

5. Zusammenfassung

Die zur Klärung des hepatozellulären Aufnahmemechanismus von Bilirubin und Fettsäuren sowie zur intestinalen Resorption von Fettsäuren durchgeführten Untersuchungen ergaben folgende Ergebnisse:

1. Obwohl die drei Klassen organischer Anionen - Bilirubin, Gallensäuren und Fettsäuren - im Serum fest an Albumin gebunden transportiert werden, fand sich kein Hinweis dafür, daß ein spezifischer Albuminrezeptor an ihrer Aufnahme in die Leberzelle beteiligt ist. In Inkubationsexperimenten konnte keine spezifische Bindung von ^{125}J-Rattenalbumin an isolierte Rattenleberplasmamembranen nachgewiesen werden, noch ließ sich aus dem Plasmamembranproteingemisch ein Bindungsprotein mit hoher Affinität für Albumin isolieren.

2. Die Isolation von Leberplasmamembranbindungsproteinen für Bilirubin / BSP und Fettsäuren, sowie die vorher beschriebene (60, 66, 122) Identifikation von Gallensäuren bindenden Membranproteinen ist mit der Hypothese vereinbar, daß die hepatozelluläre Aufnahme organischer Anionen durch spezifische Rezeptoren vermittelt wird. Da sich die isolierten Membranproteine sowohl immunologisch als auch physikochemisch voneinander unterscheiden, kann angenommen werden, daß die drei Klassen organischer Anionen mittels getrennter Transportsysteme in die Leber aufgenommen werden. Dies würde die in Voruntersuchungen beschriebene unterschiedliche Aufnahmekinetik dieser organischen Anionen erklären.

3. Das Bilirubin / BSP bindende Membranprotein ist ein dimeres Glycoprotein mit 55.000 Dalton Untereinheiten und einem isoelektrischen Punkt von 3,5. Mit einem Antikörper gegen dieses Protein konnte die Bindung von Bilirubin und BSP, jedoch nicht von Ölsäure und Taurocholsäure an isolierte Rattenleberplasmamembranen gehemmt werden. Immunhistochemisch ließ es sich als Bestandteil der Leberplasmamembranen nachweisen.

4. In Inkubationsexperimenten mit isolierten Rattenleberplasmamembranen und einer repräsentativen Fettsäure, ^{14}C-Ölsäure, zeigte sich spezifische, sättigungsfähige Membranbindung, die durch Hitzedenaturierung und Trypsinverdauung der Membranen aufgehoben werden konnte. Dies war der erste Hinweis dafür, daß auch Fettsäuren durch Rezeptor-vermittelten Transport intrazellulär aufgenommen werden.

5. Aus dem Leberplasmamembranproteingemisch ließ sich ein einzelnes 40.000 Dalton Protein mit hoher Affinität für verschiedene langkettige Fettsäuren, jedoch nicht für komplexe Lipide oder andere organische Anionen isolieren. Ein Antikörper gegen das Fettsäure bindende Membranprotein hemmte die spezifische Bindung von ^{14}C-Ölsäure an Rattenleberplasmamembranen, während die Bindung von ^{35}S-BSP und ^{14}C-Taurocholsäure unbeeinflußt blieb. Immunhistochemisch ließ sich das Fettsäure bindende Protein in der Plasmamembran von Hepatozyten, in den Glanzstreifen des Myokards und der Bürstensaummembran des oberen Dünndarms nachweisen.

6. Die zur Untersuchung der intestinalen Fettsäureresorption durchgeführten Inkubationsexperimente mit microvillösen Membranen des Rattenjejunums zeigten ebenfalls spezifische Bindung von ^{14}C-Ölsäure, die durch den Antikörper gegen das Fettsäure bindende Protein der Leber aufgehoben werden konnte. Das aus diesen Membranen isolierte Fettsäure bindende Protein war identisch mit dem der Leber.

7. In vivo Untersuchungen mit isolierten Rattenhepatozyten zeigten, daß die zelluläre Aufnahme von Fettsäuren alle Kriterien eines spezifischen, energieabhängigen Transportmechanismus erfüllt und möglicherweise an die membrangebundene Na^+-K^+ ATPase gekoppelt ist.

8. Die spezifische Hemmung des hepatozellulären Fettsäureeinstroms durch das Anti-Fettsäure bindende Membranprotein bewies die biologische Signifikanz des isolierten Fettsäurerezeptorproteins.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse leisten einen Beitrag zum Verständnis der Physiologie Rezeptor-vermittelter zellulärer Transportprozesse. Es werden neue Erkenntnisse zum hepatozellulären Aufnahmemechanismus organischer Anionen, welcher eine Vitalfunktion der Leber darstellt, beschrieben. Der erstmals gelungene Nachweis eines spezifischen Fettsäurerezeptorproteins in Leber und Darm ist von potentiellem Interesse bei der Regulation des Fettsäurestoffwechsels.

6. Literaturverzeichnis

1. Abumrad, N.A., Perkins, R.C., Park, J.H., Park, C.R.: Mechanism of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte. J. Biol. Chem. 256: 9183 - 9191, 1981.

2. Abumrad, N.A., Park, J.H., Park, C.R.: Permeation of long chain fatty acid into adipocytes. Kinetics, specificity, and evidence for involvement of a membrane protein. J. Biol. Chem. 259: 8945 - 8953, 1984.

3. Accatino, L., Simon, F.R.: Isolation and characterization of a bile acid receptor in isolated liver surface membranes. J. Clin. Invest. 57: 496 - 508, 1976.

4. Andersen, B.L., Torpley, H.L., Regen, D.M.: Characterization of ß-hydroxybutyrate transport in rat erythrocytes and thrombocytes. Biochim. Biophys. Acta 508: 525 - 538, 1978.

5. Anwer, M.S.: Hegner, D.: Effect of organic anions on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes.Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359: 1027 - 1030, 1978.

6. Baker, K.J., Bradley, S.E.: Binding of sulfobromophthalein (BSP) sodium by plasma albumin. Its role in BSP extraction. J. Clin. Invest. 45: 81 - 287, 1966.

7. Balfour, A.H., Jones, E.A.: The binding of plasma proteins to human placental cell membranes. Clin. Sci. Mol. Med. 52: 383 - 394, 1977.

8. Bartlett, G.A.: Phosphorous assay in column chromatography. J. Biol. Chem. 243: 4494 - 4501, 1968.

9. Baudhuin, P., Evrard, P., Berthed, J.: Electron microscopic examination of subcellular fractions. In: The preparation of representative samples from suspensions of particles. J. Cell. Biol. 32: 181 - 191, 1967.

10. Benz, R., Lauger, P., Janko, K.: Transport kinetics of hydrophobic anions in lipid bilayer membranes: chargepulse relaxation studies. Biochim. Biophys. Acta 455: 701 - 720, 1976.

11. Berk, P.D. Howe, R.B., Bloomer, J.R., Berlin, N.I.: Studies of bilirubin kinetics in normal adults. J. Clin. Invest. 48: 2176 - 2190, 1969.

12. Berk, P.D., Stremmel, W., Okuda, H., Tavoloni, N., Kochwa, S., Potter, B., Shepard, M., Kiang, C.-L.: Mechanism of hepatic organic anion uptake. In: H. Brunner, ed., Hepatology 1983. Raven Press, New York, 1984 (im Druck).

13. Berk, P.D.: Bilirubin metabolism and the hereditary hyperbilirubinemias. In: Berk, J.E., Haubrich, W.S., Kalser, M.H., Roth, J.L.A., Schaffner, F., eds. Bockus Gastroenterology. W.B. Saunders, Philadelphia, 1985 (im Druck).

14. Bernstein, L.H., Ben-Ezzer, J., Gartner, L., Arias,I.M.: Hepatic intracellular distribution of tritium-labeled unconjugated and conjugated bilirubin in normal and Gunn rats. J. Clin. Invest. 45: 1194 - 1201, 1966.

15. Berry, M.N., Friend, D.S.: High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. J. Cell. Biol. 43: 506 - 520, 1969.

16. Bloomer, J.R., Berk, P.D., Vergalla, J., Berlin, N.I.: Influence of albumin on the hepatic uptake of unconjugated bilirubin. Clin. Sci. 45: 505 - 516, 1973.

17. Bloomer, J.R., Zaccaria, J.: Effect of grades bilirubin loads on biliburin transport by perfused rat liver. Am. J. Physiol. 230: 736 - 742, 1976.

18. Brandes, J.M.L., Tavoloni, N., Potter, B., Stremmel, W., Shepard, M.: Transport of bilirubin by the isolated, perfused human placenta. Hepatology 1: 498, 1981 (Abstract).

19. Chen, F.: Removal of fatty acid from serum albumin by charcoal. J. Biol. Chem. 242: 173 - 181, 1967.

20. Cheng, S., Levy, D.: Characterization of the anion transport system in hepatocyte plasma membranes. J. Biol. Chem. 255: 2637 - 2640, 1980.

21. Chowdury, V.: Photoaffinity labeling of biological systems. Ann. Rev. Biochem. 48: 293 - 325, 1979.

22. Christiansen, R.Z.: Regulation of palmiteate metabolism by carnitine and glucagon in hepatocytes isolated from fasted and carbohydrate refed rats. Biochim. Biophys. Acta 448: 249 - 272, 1977.

23. Cornelius, C.E., Ben-Ezzer, J., Arias, I.M.: Binding of sulfobromophthalein sodium (BSP) and other organic anions by isolated hepatic cell plasma membranes in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 124: 665 - 667, 1967.

24. Corrin, H.L., Klevens, H.B., Harkin, W.D.: The determination of critical concentrations for the formation of soap micelles by the spectral behaviour of pinycyanol chloride. J. Chem. Phys. 14: 480 - 486, 1946.

25. Cuatrecasas, P.: Membrane Receptors. Ann. Rev. Biochem. 43: 169 - 214, 1981.

26. DeGrella, R.F., Light, R.J.: Uptake and metabolism of fatty acids by dispersed adult rat heart myocytes. J. Biol. Chem. 255: 9731 - 9738, 1980.

27. DeGrella, R.F., Light, R.J.: Uptake and metabolism of fatty acids by dispersed adult rat heart myocytes. J. Biol. Chem. 255: 9739 - 9745, 1980.

28. Dewald, B., Dulaney, J.T., Touster, O.: Solubilization and polyacrylamide gel electrophoresis of membrane enzymes with detergents. Methods Enzymol. 32: 82 - 91, 1974.

29. Erlinger, S.: Hepatocyte bile secretion: current views and controversies. Hepatology 1: 352 - 359, 1981.

30. Faerch, T., Jacobsen, J.: Determination of association and dissociation rate constants for bilirubin-bovine serum albumin. Arch. Biochem. Biophys. 168: 351 - 357, 1975.

31. Fehrnstrom, H., Moberg, U.: SDS and conventional polyacrylamide gel electrophoresis with LKB 2117 Multiphor. Application note 306, LKB, Broma, Schweden: 1 - 15.

32. Fleischer, G.M., Arias, I.M.: Structure and function of ligandin (Y protein, GSH transferase B) and Z protein in the liver: a progress report. In: Popper, H., Schaffner, F., eds. Progress in Liver Disease, Vol. V. New York: Grune and Stratton, 172 - 182, 1976.

33. Forker, E.L.: Mechanism of hepatic bile formation. Ann. Rev. Physiol. 39: 323 - 347, 1977.

34. Forker, E.L., Luxon, B.: Hepatic transport kinetics and plasma disappearance curves: distributed modeling versus conventional approach. Am. J. Physiol. 235: 323 - 347, 1977.

35. Forker, E.L., Luxon, B.A.: Albumin helps mediate removal of taurocholate by rat liver. J. Clin. Invest. 67: 1517 - 1522, 1981.

36. Forker, E.L., Luxon, B.A., Snell, M., Shurmantine, W.O.: Effect of albumin binding on the hepatic transport of rose bengal: surface-mediated dissociation of limited capacity. J. Pharmacol. Exp. Therapeut. 223: 342 - 347, 1982.

37. Forker, E.L., Luxon, B.A.: Albumin-mediated transport of rose bengal by perfused rat liver. Kinetics of the reaction at the cell surface. J. Clin. Invest. 72: 1764 - 1771, 1983.

38. Freychert, P., Kahn, R., Roth, J., Neville, D.M.: Insulin interactions with liver plasma membranes. J. Biol. Chem. 247: 3953 - 3961, 1972.

39. Fujita, M., Matsui, H., Nagano, K., Nakao, M.: Asymetric distribution of ouabain-sensitive ATPase activity in rat intestinal mucosa. Biochim. Biophys. Acta 233: 404 - 408, 1971.

40. Gartner, U., Stockert, R.J., Levine, W.G., Wolkoff, A.W.: Effect of nafenopin on the uptake of bilirubin and sulfobromophthalein by the isolated, perfused rat liver. Gastroenterology 83: 1163 - 1169, 1982.

41. Gerber, M.A., Garfinkel, E., Hirschman, S.Z., Thung, S.N., Panagiotatos, T.: Immune and enzyme histochemical studies of a human hepatocellular carcinoma line producing hepatitis B surface antigen. J. Immunol. 126: 1085 - 1089, 1981.

42. Goodman, D.S.: The interaction of human serum albumin with long chain fatty acid anions. I. Am. Chem. Soc. 80: 3892 - 3898, 1958.

43. Goresky, C.A.: Initial distribution and rate of uptake of sulfobromophthalein in the liver. Am. J. Physio. 207: 13 - 26, 1964.

44. Goresky, C.A.: The hepatic uptake and excretion of sulfobromophthalein and bilirubin. Can. Med. Assoc. J. 92: 851 - 857, 1965.

45. Goresky, C.A.: Hepatic membrane carrier transport processes: their involvement in bilirubin uptake. In: Berk, P.D., Berlin, N.I., eds. The Chemistry and Physiology of Bile Pigments. Washington DC: US Government Printing Office, 265 - 281, 1977.

46. Gray, R.D., Stroupe, S.D.: Kinetics and mechanism of bilirubin binding to human serum albumin. Arch. Biochem. Biophys. 168: 351 - 357, 1978.

47. Heimberg, M., Goh, E.H., Klausner, H.J., Soler-Argilaga, C., Weinstein, J., Wilcox, H.G.: Regulation of hepatic metabolism of free fatty acids: Interrelationships among secretion of very low density lipoproteins, ketogenesis and cholesterogenesis. Eds.: J.M. Dietschy, A.M. Gotto, and J.A. Ontko: Disturbances in Lipid and Lipoprotein Metabolism. Baltimore, Williams and Wilkins, 1978.

48. Hierowsky, M., Brodersen, R.: Covalent binding of bilirubin to agarose and use of the product for affinity chromatography of serum albumin. Biochim. Biophys. Acta 354: 121 - 129, 1974.

49. Hopf, U., Meyer zum Büschenfelde, K.-H., Dierich, M.P.: Demonstration of binding sites for IgG Fc and the third complement component (C3) on isolated hepatocytes. J. Immunol. 117: 639 - 645, 1976.

50. Horecker, B.L., Smyrniotis, P.Z.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Methods Enzymol. 1: 323 - 327, 1955.

51. Hui, D.Y., Innerarity, T.L., Mahley, R.W.: Lipoprotein binding to canine hepatic membranes. J. Biol. Chem. 256: 5646 - 5655, 1981.

52. Iga, T., Eaton, D.L., Klassen, C.D.: Uptake of unconjugated bilirubin by isolated rat hepatocytes. Am. J. Physiol. 236: C9 - C14, 1979.

53. Jones, E.A., Vierling, J.M., Steer, C.J., Reichen, J.: Cell surface receptors in the liver. In: Popper, H., Schaffner, F., eds. Progress in Liver Disease, Vol. VI. New York: Grune and Stratton, 43 - 80, 1979.

54. Kamisaka, K., Listowsky, I., Betheil, J.J., Arias, I.M.: Competitive binding of bilirubin, sulfobromophthalein, indocyanine green and other organic anions to human and bovine serum albumin. Biochim. Biophys. Acta 365: 169 - 180, 1974.

55. Kamisaka, K., Listowsky, I., Gatmaitan, Z., Arias, I.M.: Interaction of bilirubin and other ligands with ligandin. Biochemistry 14: 2175 - 2180, 1975.

56. Kessler, M., Acuto, O., Storelli, C., Murer, H., Müller, M., Semenza, G.: A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. Their use in investigating some properties of D-glucose and choline transport systems. Biochim. Biophys. Acta 506: 136 - 154, 1978.

57. Ketterer, B., Neumcke, B., Lauger, P.: Transport mechanism of hydrophobic anions through lipid bilayers. J. Membr. Biol. 5: 225 - 245, 1971.

58. Klevens, H.B.: Structure and aggregation in dilute solutions of surface active reagents. I. Am. Oil Chem. Soc. 30: 74 - 80, 1953.

59. Kochwa, S.: Isoagglutinins associated with ABO erythroblastosis. J. Clin. Invest. 40: 874 - 883, 1961.

60. Kramer, W., Bickel, U., Buscher, H.-P., Gerok, W., Kurz, G.: Bile-salt-binding polypeptides in plasma membranes of hepatocytes revealed by photoaffinity labelling. Eur. J. Biochem. 129: 13 - 24, 1982.

61. Kuhl, W.E., Spector, A.A.: Uptake of long chain fatty acid methyl esters by mamalian cells. J. Lipid. Res. 11: 458 - 465, 1970.

62. Kushlan, M. Gollan, J., Ma, W.-L., Ockner, R.: Sex differences in hepatic uptake of long chain fatty acids in single-pass perfused rat liver. J. Lipid. Res. 22: 431 - 436, 1981.

63. Laperche, Y., Preux, A.-M., Feldmann, G., Mahu, J.-L., Berthelot, P.: Effect of fasting on organic anion uptake by isolated rat liver cells. Hepatology 1: 617 - 621, 1981.

64. Lefevre, P.G.: The present state of the carrier hypothesis. Curr. Top. Membr. Transp. 7: 109 - 215, 1975.

65. Levy, A.J., Gatmaitan, Z., Arias, I.M.: Two hepatic plasmatic protein fractions, Y and Z, and their possible role in the hepatic uptake of bilirubin, sulfobromophthalein, and other anions. J. Clin. Invest. 48: 2156 - 2166, 1969.

66. Levy, D., von Dippe, P.: Reconstitution of the bile acid transport system derived from hepatocyte sinusoidal membranes. Hepatololgy 3: 837, 1983 (Abstract).

67. Lowry, C.H., Rosebrough, N.J., Lewis Farr, A., Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265 - 275, 1951.

68. Lunazzi, G., Tiribelli, C., Gazzin, B., Sottocasa, G.: Further studies on bilitranslocase, a plasma membrane protein involved in hepatic organic anion uptake. Biochim. Biophys. Acta 685: 117 - 122, 1982.

69. Luxon, B.A., Forker, E.L.: Distributed modeling of hepatic uptake: the effect of non-equilibrium protein binding. Hepatology 3: 845, 1983 (Abstract).

70. Macey, R.I., Farmer, R.E.L.: Inhibition of water and solute permeability in human red cells. Biochim. Biophys. Acta 211: 104 - 106, 1970.

71. Mahadevan, S., Sauer, F.: Effect of trypsin, phospholipases, and membrane-impermeable reagents on the uptake of palmitic acid by isolated rat liver cells. Arch. Biochem. Biophys. 164: 185 - 193, 1974.

72. Mahu, J.-L., Duvaldestin, P., Dhumeaux, D., Bethelot, P.: Biliary transport of cholephilic dyes: evidence for two different pathways. Am. J. Physiol. 232: E445 - E450, 1977.

73. Marchesi, V.T., Palade, G.E.: The localisation of Mg-Na-K-activated adenosine triphosphatase on red cell ghost membranes. J. Cell. Biol. 35: 385 - 404, 1967.

74. McConahey, P.J., Dixon, F.J.: A method of trace iodination of proteins for immunologic studies. Int. Arch. Allergy 29: 185 - 189, 1966.

75. Michell, R.H., Hawthorne, J.N.: The site of diphosphoinositide synthesis in rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 21: 333 - 338, 1965.

76. Neville, D.M. Jr.: Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. J. Biol. Chem. 246: 6328 - 6334, 1971.

77. Nisonoff, A., Pressman, D.: Heterogeneity and average combinding constants of antibodies from individual rabbits. J. Immunol. 80: 417 - 428, 1958.

78. Ockner, R.K., Burnett, D.A., Lysenko, N., Manning, J.A.: Sex differences in long chain fatty acid utilization and fatty acid binding protein concentration in rat liver. J. Clin. Invest.: 172 - 181, 1979.

79. Ockner, R.K., Lysenko, N., Manning, J., Monroe, S., Burnett, D.: Sex steroid modulation of fatty acid utilization and fatty acid binding protein concentration in the rat liver. J. Clin. Invest. 65: 1013 - 1023, 1980.

80. Ostrow, J.D., Schmid, R.: The protein-binding of ^{14}C-bilirubin in human and murine serum. J. Clin. Invest. 42: 1286 - 1298, 1963.

81. Paris, S., Samuel, D., Romey, G., Ailhaud, G.: Uptake of fatty acids by cultured cardiac cells from chick embryo: evidence for a facilitation process without energy dependence. Biochimie 61: 185 - 193, 1979.

82. Parkes, J.G., Thompson, W.: The composition of phospholipids in outer and inner mitochondrial membranes from guined-pig liver. Biochim. Biophys. Acta 196: 162 - 169, 1970.

83. Paumgartner, G., Probst, P., Kraines, R., Leevy, C.M.: Kinetics of indocyanine green removal from the blood. Ann. NY Acad. Sci. 170: 134 - 147, 1970.

84. Paumgartner, G., Reichen, J.: Different pathways for hepatic uptake of taurocholate and indocyanine green. Experientia 31: 306 - 307, 1975.

85. Paumgartner, G., Reichen J.: Kinetics of hepatic uptake of unconjugated bilirubin. Clin. Sci. Mol. Med. 51: 169 - 176, 1976.

86. Peters, T., Taniuchi, H. Jr., Anfinsen, C.A. Jr.: Affinity chromatography of serum albumin with fatty acids immobilized on agarose. J. Biol. Chem. 248: 2447 - 2451, 1973.

87. Plotz, P.H., Berk, P.D., Scharschmidt, B.F., Gordon, J.K., Vergalla, J.: Removing substances from blood by affinity chromatography. In: Removing bilirubin and other albumin bound substances from plasma and blood with albumin-conjugated agarose beads. J. Clin. Invest. 53: 778 - 785, 1974.

88. Porath, J., Sundberg, L.: High capacity chemisorbents for protein immobilization. Nature New Biol. 238: 261 - 262, 1972.

89. Renaud, G., Foliot, A., Infante, R.: Increased uptake of fatty acids by the isolated rat liver after raising the fatty acid binding protein concentration with clofibrate. Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 327 - 334, 1978.

90. Reichen, J., Paumgartner, G.: Kinetics of taurocholate uptake by the perfused rat liver. Gastroenterology 68: 132 - 136, 1975.

91. Reichen, J., Berk, P.D.: Isolation of an organic anion binding protein from rat liver plasma membrane by affinity chromatography. Biochem. Biophys. Res. Commun. 91: 484 - 489, 1979.

92. Reichen, J., Blitzer, B.L., Berk, P.D.: Binding of unconjugated and conjugated sulfobromophthalein to rat liver plasma membrane fractions in vitro, Biochim. Biophys. Acta 640: 298 - 312, 1981.

93. Samuel, D., Paris, S., Ailhaud, G.: Uptake and metabolism of fatty acids and analogues by cultured cardiac cells from chick embryos. Eur. J. Biochem. 64: 583 - 595, 1976.

94. Scratchard, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. NY Acad. Sci. 51: 660 - 674, 1949.

95. Scharschmidt, B.F., Waggoner, J.G., Berk, P.D.: Hepatic organic anion uptake in the rat. J. Clin. Invest. 56: 1280 - 1292, 1975.

96. Scharschmidt, B.F., Gollan, J.L.: Current concepts of bilirubin metabolism and hereditary hyperbilirubinemia. In: Popper, H., Schaffner, F., eds. Progress in Liver Disease, Vol. VI. New York: Grune and Stratton, 187 - 212, 1979.

97. Scharschmidt, B.F.: Bile formation and cholestasis, metabolism and enterohepatic circulation of bile acids, and gallstone formation. In: Zakim, D., Boyer, T.D., eds. Hepatology. Philadelphia: W.B. Saunders, 297 - 335, 1982.

98. Scheider, W.: Dissociation rate of serum albumin-fatty acid complex from stop-flow dielectric study of ligand exchange. Biophys. J. 24: 260 - 262, 1978.

99. Schenkman, J.B., Cinti, D.L.: Hepatic mixed function oxidase activity in rapidly prepared microsomes. Life Science 2: 247 - 257, 1972.

100. Schmitz, J., Preiser, H., Maestracci, D., Ghosh, B.K., Cerda, J.J., Crane, R.K.: Purification of the human intestinal brush border membrane. Biochim. Biophys. Acta 323: 98 - 112, 1973.

101. Shepard, E., Hubscher, G.: Phosphatidate biosynthesis in mitochondrial subfractions of rat liver. Biochem. J. 113: 429 - 440, 1969.

102. Shuppeck, M., Wolkoff, A.W., Scharschmidt, B.F., Waggoner, J.G., Berk, P.D.: Studies of the kinetics of purified conjugated bilirubin-^{3}H in the rat. Am. J. Gastroenterology 70: 259 - 264, 1978.

103. Soerensen, S.P.L.: Enzymstudien. Über die Messung und Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen. Biochem. Z. 21: 131 - 200, 1909.

104. Spector, A.A., Fletcher, J.E.: Binding of long chain fatty acids to ß-lactoglobulin. Lipids 5: 403 - 411, 1969.

105. Spector, A.A., Fletcher, J.E., Ashbrook, J.D.: Analysis of long chain free fatty acid binding to bovine serum albumin by determination of stepwise equilibrium constants. Biochemistry 10: 3229 - 3232, 1971.

106. Spector, A.A., Fletcher, J.E.: Transport of fatty acid in the circulation. Eds.: J.M. Dietschy, A.M. Gotto, and J.A. Ontko: Disturbances in lipid and lipoprotein metabolism. Baltimore, Williams and Wilkins, 1978.

107. Stollman, Y.R., Gartner, U.,Theilmann, L., Ohmi, N., Wolkoff, A.W.: Hepatic bilirubin uptake in the isolated perfused rat liver is not facilitated by albumin binding. J. Clin. Invest. 72: 718 - 723, 1983.

108. Stremmel, W., Tavoloni, N., Berk, P.D.: Uptake of bilirubin by the liver. Sem. Liver Dis. 3: 1 - 10, 1983.

109. Stremmel, W., Potter, B.J., Berk, P.D.: Studies of albumin binding to rat liver plasma membranes: implications for the albumin receptor hypothesis. Biochim. Biophys. Acta 756: 20 - 27, 1983.

110. Stremmel, W. Kochwa, S., Berk, P.D.: Studies of oleate binding to rat liver plasma membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 112: 88 - 95, 1983.

111. Stremmel, W., Gerber, M.A., Glezerov, V., Thung, S.N., Kochwa, S., Berk, P.D.: Physicochemical and immunhistological studiesofa sulfobromophthalein- and bilirubin-binding protein from rat liver plasma membranes. J. Clin. Invest. 71: 1796 - 1805, 1983.

112. Stremmel, W., Strohmeyer, G., Borchard, F., Kochwa, S., Berk, P.D.: Isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein in rat liver plasma membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985 (im Druck).

113. Stremmel, W., Lotz, G., Strohmeyer, G., Berk, P.D.: Identification, isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat liver jejunal microvillous membranes. J. Clin. Invest. 1985 (im Druck).

114. Stremmel, W., Strohmeyer, G., Berk, P.D.: Hepatocellular uptake of oleate is energy dependent, sodium linked, and inhibited by an antibody to a hepatocyte plasma membrane fatty acid binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985 (zur Publikation angenommen).

115. Sugiyama, Y., Yamada, T., Kaplowitz, N.: Newly identified bile acid bindings in rat liver cytosol: purification and comparison with glutathione S-transferase. J. Biol. Chem. 258: 3602 - 3607, 1983.

116. Svenson, A., Holmer, E., Andersson, L.: A new method for the measurement of dissociation rates for complexes between small ligands and proteins applied to the palmitate and bilirubin complexes with serum albumin. Biochim. Biophys. Acta 342: 54 - 59, 1974.

117. Teorell, T., Stenhagen, E.: Ein Universalpuffer für den pH-Bereich 2,0 - 12,0. Biochem. Z. 299: 416 - 430, 1938.

118. Thung, S.N., Gerber, M.A.: Polyalbumin receptors: their role in the attachment of hepatitis B virus to hepatocytes. Sem. Liv. Dis. 4: 69 - 75, 1984.

119. Tiribelli, C., Ranfili, E., Sandri, G., Frezza, M., Sottocasa, G.L.: Liver sulfobromophthalein transport as a carrier mediated process. In: Leevy, C.M., ed. Diseases of the liver and biliary tract. Basel: Karger, 55 - 59, 1976.

120. Tiribelli, C., Lunazzi, G., Luciani, G.L., Panfili, E., Gazzin B., Liut, G., Sandri, G., Sottocasa, G.: Isolation of a sulfobromophthalein-binding protein from hepatocyte plasma membrane. Biochim. Biophys. Acta 532: 105 - 112, 1978.

121. Van Bezooijen, C.F., Grell, A.T., Knook, D.L.: Bromsulfophthaleine uptake by isolated liver parenchymal cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 69: 354 - 361, 1976.

122. Von Dippe, P., Levy, D.: Characterization of the bile acid transport system in normal and transformed hepatocytes. J. Biol. Chem. 258: 8896 - 8901, 1983.

123. Weisiger, R., Gollan, J., Ockner, R.: Receptor for albumin on the liver cell surface may indicate uptake of fatty acids and other albumin-bound substances. Science 211: 1048 - 1051, 1981.

124. Weisiger, R., Gollan, J., Ockner, R.: The role of albumin in hepatic uptake processes. In: Popper, H., Schaffner, F., eds. Progress in Liver Disease, Vol. VII, New York: Grune and Stratton, 71 - 85, 1982.

125. Weisiger, R.: Organic anion uptake limited by the rate of dissociation from albumin: predictions of a new general formulation for the "classical" uptake model. Hepatology 3: 869, 1983 (Abstract).

126. Wheeler, H.O., Meltzer, J.I., Bradley, S.E.: Biliary transport and hepatic storage of sulfobromophthalein sodium in the unanesthetized dog, in normal man, and in patients with hepatic disease. J. Clin. Invest. 39: 1131 - 1144, 1960.

127. Wieth, T.O., Dalmark, M., Gunn, R.B., Tosteson, D.C.: The transfer of monovalent inorganic anions through the red cell membrane. In: Erythrocytes, thrombocytes, leucocytes (Gerlach, E., Moser, K., Deutsch, E., Williams, W., eds.) 71 - 91, Thieme Verlag, Stuttgart.

128. Wisher, M.H., Evans, W.H.: Functional polarity of the rat hepatocyte surface membrane. Isolation and characterization of plasma membrane subfractions from the blood-sinusoidal bile-canalicular and contiguous surfaces of the hepatocyte. Biochem. J. 146: 375 - 388, 1974.

129. Wolkoff, A.W., Goresky, C.A., Sellin, J., Gatmaitan, Z., Arias, I.M.: Role of ligandin in transfer of bilirubin from plasma into liver. Am. J. Physiol. 236: E638 - E648, 1979.

130. Wolkoff, A.W., Weisiger, R.A., Jakoby, W.B.: The multiple roles of the glutathione transferases (ligandins). In: Popper, H., Schaffner, F., eds. Progress of Liver Disease. Vol. VI. New York, Grune and Stratton, 213 - 224, 1979.

131. Wolkoff, A.W., Chung, C.T.: Identification, purification and partial characterization of an organic anion binding protein from rat liver plasma membranes. J. Clin. Invest. 71: 1795 - 1805, 1983.

132. Wolkoff, A.W., Sosiak, A., Van Kensswoude, J., Stockert, R.J.: Immunological localization of an organic anion binding protein (OABP) isolated from rat liver cell plasma membranes. Hepatology 3: 875, 1983 (Abstract).

133. Wosilait, W.D., Soler-Argilaga, C., Nagy, P.: A theoretical analysis of the binding of palmitate by human serum albumin. Biochem. Biophys. Res. Comm. 71: 419 - 428, 1976.